

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Ralf Kinscherf
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Kompartimente der Weißen Milzpulpa bei Ratten

-

Immunhistologische Darstellung von Stromazellen, Lymphozyten und Makrophagen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
(Dr. med.)

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Alissa Mecha
aus Datteln

Marburg, 2021

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg am:

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin

Dekanin: Prof. Dr. D. Hilfiker-Kleiner

Referentin: Prof. Dr. B. Steiniger

Korreferent/in:

*Für meine wunderbare Familie
und Daisy*

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	3
1. EINLEITUNG	
1.1 Funktion der Milz	5
1.2 Klinische Aspekte der Splenektomie	6
1.3 Die Milz bei Ratten	10
1.3.1 Ratten als Versuchstiere	10
1.3.2 Mikroskopischer Aufbau der Milz bei Ratten	12
2. MATERIAL UND METHODEN	
2.1 Versuchstiere und Organe	21
2.2 Aufarbeitung der Milzen – Vom Organ zum Schnittpräparat	21
2.3 Immunhistochemie	22
2.4 Primär- und Sekundärantikörper	24
2.5 Allgemeiner Versuchsablauf für Peroxidase-Systeme	25
2.5.1 Pufferlösungen	26
2.5.2 Vorbehandlung der Schnitte	26
2.5.3 Vorblockierung der endogenen Peroxidase-Aktivität	27
2.5.4 Primärantikörper	28
2.5.5 Sekundärantikörper und Nachweis	29
2.5.6 Farbentwicklung	30
2.5.7 Eindecken	31
3. ERGEBNISSE	
3.1 Stromazellen und extrazelluläre Matrix	33
3.1.1 – 1A29 (CD54 / ICAM-1; Abb.3)	33
3.1.2 – 5F10 (CD106 / VCAM-1; Abb.4)	35
3.1.3 – anti-Pan-Laminin (Laminin; Abb.5)	36
3.1.4 asm-1 (Glattmuskel-alpha-Aktin; Abb.6)	38
3.1.5 Ox43 (Antigen unbekannt; Abb.7)	39
3.1.5.1 Ox43 – Verteilung in anderen Organen	41

3.2 B-Zellen	46
3.2.1 His57 (Antigen unbekannt; Abb.13)	47
3.2.1.1 Doppelfärbung 5F10 und His57 (Abb.14, 15)	47
3.2.1.2 Doppelfärbung Laminin und His57 (Abb.16)	49
3.2.1.3 Doppelfärbung asm-1 und His57 (Abb.17)	50
3.2.2 MARD-3 (IgD; Abb.18, 19)	50
3.2.3 IgM (IgM; Abb.20)	52
3.2.3.1 Doppelfärbung IgM und MIB-5 (Abb. 21, 22, 23)	53
3.2.4 Ox33 (CD45RA; Abb.24)	56
3.3 Erythrozyten	58
3.3.1 His 49 (Erythrozyten; Abb.25) und DAB-Färbung (Abb.26)	58
3.4 Granulozyten	59
3.4.1 RP-1 (Neutrophile Granulozyten; Abb.27)	59
3.5 Endothelzellen	60
3.5.1 His52 (RECA-1; Abb.28)	60
3.6 Makrophagen	61
3.6.1 ED2 (CD163; Abb.29)	61
3.6.2 ED3 (CD169 / Sialoadhesin; Abb.30)	62
3.7 T-Zellen	64
3.7.1 Ox8 (CD8, alpha-Kette; Abb.31)	64
3.7.2 Ox34 (CD2; Abb.32)	65
3.7.2.1 Doppelfärbung ED3 und Ox34 (Abb.33)	66
3.7.3 R73 (TCR; Abb.34)	66
4. DISKUSSION	68
5. ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY	85
LITERATURVERZEICHNIS	89
ANHANG	97
– Lebenslauf	
– Verzeichnis der akademischen Lehrer/-innen	
– Danksagung	
– Ehrenwörtliche Erklärung	

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A.	Arteria
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-biotinylated peroxidase complex (Avidin-Biotin-Komplex)
A. bidest.	Aqua bidestillata
A. dest.	Aqua destillata
AID	activation induced deaminase
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
bpm	beats per minute
BSA	Bovines Serumalbumin
BV	Bright Vision
CD	Cluster of differentiation
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DF	Doppelfärbung
EF	Einfachfärbung
F	Follikel
FDC	Follicular dendritic cell
FDCs	Follicular dendritic cells (Follikuläre dendritische Zellen)
FRC	Fibroblastic reticulum cell
FRCs	Fibroblastic reticulum cells (Fibroblastische Retikulumzellen)
HDPB	High Def Blue for Peroxidase
HE	Hämatoxylin-Eosin
Hib	Haemophilus influenzae Typ B
IDC	Interdigitierende dendritische Zelle
IDCs	Interdigitierende dendritische Zellen
Ig	Immunglobulin
LEW	Lewis
Lig.	Ligamentum
mAb	monoclonal antibody (Monoklonaler Antikörper)
mAbs	monoclonal antibodies (Monoklonale Antikörper)
MALT	Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe

MMM	Marginale metallophile Makrophagen
MRC	Marginal reticulum cell
MRCs	Marginal reticulum cells
MS	Marginalsinus
MZ	Marginalzone
MZBC	Marginal zone bridging channel
MZM	Marginalzonen-Makrophagen
NRS	Normalrattenserum
OPSI	Overwhelming postsplenectomy infection
PALS	Periarterielle lymphatische Scheide
PBS	Phosphate buffered saline
RNA	Ribonukleinsäure
RP	Rote Pulpa
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
S.	Seite
SPF	spezifiziert pathogenfrei
STIKO	Ständige Impfkommision des Robert-Koch-Instituts
TBS	Tris(hydroxymethyl)aminomethane buffered saline
V.	Vena
WP	Weiße Pulpa
ZA	Zentralarterie

ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

Abbildungen

Abb.	Titel	Seite
1a)	Kompartimente in der Rattenmilz	13
1b)	Schematischer Aufbau der Milz bei Ratten	13
2	ABC-Methode – Schematische, stark vereinfachte Darstellung	23
3	Nachweis von 1A29 (Cryo, Einfachfärbung mit DAB)	34
4	Nachweis von 5F10 (Cryo, Einfachfärbung mit DAB)	36
5	Nachweis von anti-Pan-Laminin (Cryo, Einfachfärbung mit DAB)	37
6	Nachweis von asm-1 (Cryo, Einfachfärbung mit DAB)	39
7	Nachweis von Ox43 (Cryo, Einfachfärbung mit DAB)	40
8	Nachweis von Ox43 im Pankreas (Cryo, Einfachfärbung mit DAB)	41
9	Nachweis von Ox43 im Herzen (Cryo, Einfachfärbung mit DAB)	42
10	Nachweis von Ox43 in der Nierenrinde (Cryo, Einfachfärbung mit DAB)	43
11	Nachweis von Ox43 in der Leber (Cryo, Einfachfärbung mit DAB)	44
12	Nachweis von Ox43 im Großhirn (Cryo, Einfachfärbung mit DAB)	45
13	Nachweis von His57 (DAB) (Cryo, Einfachfärbung)	47
14	Nachweis von 5F10 (DAB) und His57 (Enzo Blue) (Cryo)	48
15	Nachweis von 5F10 (DAB) und His57 (Enzo Blue) (Cryo)	48
16	Nachweis von Laminin (DAB) und His57 (Fast Blue) (Cryo)	49
17	Nachweis von asm-1 (DAB) und His57 (Fast Blue) (Cryo)	50
18	Nachweis von MARD-3 (DAB) (Cryo, Einfachfärbung, HE)	51
19	Nachweis von MARD-3 (DAB) (Cryo, Einfachfärbung, HE)	52
20	Nachweis von IgM (DAB) bei hoher Verdünnung zur Vermeidung der Mitfärbung von interstitiellem IgM (Cryo, Einfachfärbung, 1:4000)	53
21	Nachweis von MIB-5 (DAB) und intrazellulärem IgM (HistoGreen)	54
22	Nachweis von MIB-5 (DAB) und intrazellulärem IgM (HistoGreen)	55
23	Nachweis von MIB-5 (DAB) und intrazellulärem IgM (HistoGreen) bei einem Sekundärfollikel	56
24	Nachweis von Ox33 (DAB) (Cryo, Einfachfärbung)	57
25	Nachweis von His49 (Cryo, Einfachfärbung mit DAB, KF)	58
26	DAB-Färbung (Paraffin, ohne Vorbehandlung, Einfachfärbung, KF)	59
27	Nachweis von RP-1 (DAB) (Cryo, Einfachfärbung, KF)	60
28	Nachweis von His52 (DAB) (Cryo, Einfachfärbung)	61
29	Nachweis von ED2 (DAB) (Cryo, Einfachfärbung, KF)	62
30	Nachweis von ED3 (DAB) (Cryo, Einfachfärbung)	63
31	Nachweis von Ox8 (DAB) (Cryo, Einfachfärbung, KF)	64
32	Nachweis von Ox34 (DAB) (Cryo, Einfachfärbung)	65
33	Nachweis von ED3 (DAB) und Ox34 (Enzo Blue) (Cryo, Doppelfärbung, KF)	66
34	Nachweis von R73 (DAB) (Cryo, Einfachfärbung, KF)	67

Tabellen

Tab.	Titel	Seite
1	Primärantikörper für Einfachfärbungen	24
2	Doppelfärbung auf Cryo- und Paraffinschnitten	25
3	Phänotyp von Stromazellen der Weißen Pulpa	45
4	Phänotyp und Lokalisation von B-Lymphozyten	57
5	Lokalisation von Erythrozyten und Granulozyten	60
6	Phänotyp und Lokalisation von Makrophagen	63
7	Lokalisation verschiedener T-Lymphozyten-Populationen	67

1. EINLEITUNG

1.1 Funktion der Milz

Der griechische Philosoph Demokrit (etwa 460 – 370 v. Chr.) - Begründer der atomistischen Weltanschauung – nannte die Milz „eine Verirrung der Natur, welche Prometheus in der Trunkenheit erschaffen habe“ (Tischendorf, 1969). Es sollte viele Jahrhunderte andauern, bis die überlebenswichtigen Funktionen der Milz endlich erkannt wurden.

Die Milz befindet sich bei Mensch und Ratte gleichermaßen im linken Oberbauch. Ihre Konsistenz ist in vivo sehr weich („puddingartig“), wenngleich sie von einer festen, bindegewebigen Kapsel umgeben ist.

Die Milz gehört neben den Lymphknoten und dem Mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebe (MALT) zu den sekundären lymphatischen Organen und gilt unter diesen als das größte Einzelorgan. Interessanterweise verfügt die Milz lediglich über efferente Lymphgefäße; als Ein- und Austrittspforte nutzen Lymphozyten hauptsächlich die Blutgefäße der Milz (A. und V. splenica).

Bereits makroskopisch fällt die Aufteilung in zwei Kompartimente – Rote und Weiße Milzpulpa – auf. Die Weiße Pulpa (WP) stellt das lymphatische Gewebe dar; sie gilt als der Ort für Immunreaktionen. In der Roten Pulpa (RP) werden u.a. gealterte Blutzellen abgebaut („Blutzellmauserung“). Die Milz stellt damit eine in das Blutgefäßsystem eingeschaltete Filterstation dar (Lüllmann-Rauch, 2009).

Beim Menschen dient die Milz als Reservoir für Thrombozyten: bis zu einem Drittel der zirkulierenden Thrombozyten können in der Roten Milzpulpa gespeichert werden (Steiniger, 2015).

Pränatal - ab der 6. Schwangerschaftswoche - ist die Milz laut Lehrbuchmeinung neben der Leber in geringerem Umfang auch an der extramedullären Hämatopoese beteiligt (Lüllmann-Rauch, 2009).

Beim Erwachsenen kann die extramedulläre Hämatopoese im Rahmen hämato-onkologischer Erkrankungen (z.B. bei der CML – Chronische myeloische Leukämie) wieder auftreten. Ratten verfügen Zeit ihres Lebens über eine extramedulläre Blutbildung.

1.2 Klinische Aspekte der Splenektomie

In Deutschland werden jährlich über 8000 Splenektomien durchgeführt (Theilacker et al., 2016). Ein solcher Eingriff kann aufgrund einer traumatischen Milzruptur, eines Tumors der Milz oder angrenzender Organe oder deutlich seltener aufgrund einer Splenomegalie mit symptomatischer Panzytopenie im Rahmen diverser hämato-onkologischer Erkrankungen notwendig sein.

In einem *case report* in den 50er-Jahren berichteten King und Shumacker über fünf Fälle von Säuglingen, welche innerhalb ihrer ersten sechs Lebensmonate splenektomiert worden waren und sechs Wochen bis drei Jahre post-operativ aufgrund fulminanter Infektionen hospitalisiert werden mussten. Von diesen fünf Kindern erkrankten vier an Meningitis – ausgelöst durch Meningokokken bzw. *Haemophilus influenzae* Typ B; eins dieser Kinder verstarb. Ein weiteres Kind verstarb an Sepsis, ohne dass ein Erreger nachgewiesen werden konnte (King und Shumacker, 1952).

Eine Studie - mit weitaus größerem Kollektiv - an 740 amerikanischen Veteranen, welche infolge von Kriegsverletzungen während des 2. Weltkrieges splenektomiert worden waren, ergab vergleichbare Konsequenzen für Erwachsene: eine signifikant erhöhte Sterblichkeit an Pneumonie sowie Herzkrankheiten (Robinette und Fraumeni, 1977).

Der Stellenwert der Milz in der Infektabwehr wird heute nicht mehr angezweifelt. Allerdings basieren zahlreiche Erkenntnisse auf veralteten Studien und es mangelt an aktuellen, groß angelegten Metaanalysen zu diesem Thema.

In einer in den Jahren 1971 bis 1983 angelegten Studie in West-Australien konnte bei einem Kollektiv von insgesamt 1490 splenektomierten Patienten ein 12,6-fach erhöhtes Sepsis-Risiko im Vergleich zur Gesamtbevölkerung

festgestellt werden (Cullingford et al., 1991).

Die deutsche SPLEEN OFF-Studie aus den Jahren 2011 bis 2013 konnte insbesondere *Streptococcus pneumoniae* als Ursache für septische Krankheitsverläufe unter Asplenie-Patienten ausmachen (42%). Die Studie umfasste insgesamt 104 Intensivpatienten, welche bei Aufnahme die Kriterien einer Sepsis erfüllten. Die eine Hälfte war in der Vergangenheit splenektomiert worden, während die andere Hälfte als Kontrollgruppe fungierte. Bei splenektomierten Sepsis-Patienten überwog *Streptococcus pneumoniae*, während Patienten mit vorhandener Milz zusätzlich insbesondere *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus* als Erregerspektrum in ihren Blutkulturen aufwiesen. Eine weitere wichtige Beobachtung der SPLEEN OFF-Studie war die oft unzureichende Immunisierung von Asplenie-Patienten (52%) trotz entsprechender Vorgaben in Leitlinien (Theilacker et al., 2016).

Bei splenektomierten Patienten wird insbesondere das Auftreten einer *overwhelming postsplenectomy infection* (OPSI) gefürchtet:

OPSI beschreibt eine bakterielle Infektion mit kapseltragenden Bakterien wie Pneumokokken, Meningokokken oder *Haemophilus influenzae*, bei welcher es zu fulminanten septischen Krankheitsverläufen mit Todesfolge kommen kann. Eine solche Infektion kann wenige Stunden bis mehrere Jahre oder Jahrzehnte nach einer Splenektomie vorkommen, das Erkrankungsrisiko besteht ein Leben lang und ist gekennzeichnet durch eine hohe Mortalität von 50-70% (Engelhardt et al., 2013).

Als besonders gefährdet gelten splenektomierte Kinder und ältere Menschen (> 60 Jahre) sowie Patienten mit erhöhter Infektanfälligkeit, z.B. unter Chemotherapie (Engelhardt et al., 2013). Auch ein Hyposplenismus, eine verminderte Funktion der Milz, beispielsweise im Rahmen hämatologischer oder immunologischer Erkrankungen, sowie die sehr seltene kongenitale Asplenie können fulminante Infektionen bedingen.

Um OPSI vorzubeugen, sind strenge Kriterien an eine totale Splenektomie zu stellen: bei Kindern sollte nach Möglichkeit nicht unter 6 Jahren operiert werden. Besteht die Indikation aufgrund einer traumatischen Milzruptur, sind

organ-erhaltende Maßnahmen vorrangig zu wählen (Di Sabatino et al., 2011; von Bassewitz und Leutner, 2015).

Ist eine Splenektomie letztlich doch unumgänglich, muss ein ausführliches Aufklärungsgespräch mit dem Patienten bezüglich OPSI erfolgen. Dabei müssen Präventivmaßnahmen wie Antibiotikaprophylaxe und Impfungen sowie der richtige Umgang mit Infektionen erörtert werden:

Nach den Impfeempfehlungen der Ständigen Impfkommision des Robert-Koch-Instituts (STIKO) sollen **a l l e** Säuglinge und Kleinkinder Grundimmunisierungen für Haemophilus influenzae Typ B (Hib), Pneumokokken und Meningokokken erhalten (STIKO ^a), 2018).

Sollte ein Kind vor geplanter Splenektomie nicht gegen Hib geimpft sein, wird das Nachholen der Impfung dringend angeraten. Auch für Erwachsene empfiehlt die STIKO eine Nachholimpfung. Aktuell ist nicht bekannt, ob ein lebenslanger Impfschutz für Risikogruppen nach einmaliger Grundimmunisierung besteht (STIKO ^b), 2019).

Neben Säuglingen und Kleinkindern gelten die allgemeinen Impfeempfehlungen gegen Pneumokokken auch für Menschen > 60 Jahre. Für Risikopersonen wie Personen mit Asplenie gelten für Kinder, Jugendliche und Erwachsene unterschiedliche Impfreime mit entsprechenden Impfstofftypen. Über Auffrischimpfungen wird noch kontrovers diskutiert; aktuell werden Wiederholungsimpfungen in 6-Jahres-Intervallen als sinnvoll erachtet (STIKO ^b), 2019).

In Bezug auf Meningokokken sieht die STIKO für Risikogruppen neben einer Impfung gegen Meningokokken der Serogruppe C einen zusätzlichen Impfstoff gegen weitere Serotypen vor (STIKO ^b), 2019).

Desweiteren wird eine jährliche Influenza-Impfung empfohlen, um dem Risiko einer Sekundärinfektion mit Pneumokokken entgegenzuwirken (STIKO ^b), 2019).

Neben der Infektionsprophylaxe durch Impfungen wird eine Antibiotikaprophylaxe angeraten: bei Kindern wird für mindestens drei Jahre nach Splenektomie eine Prophylaxe mit Penicillin, Amoxicillin oder Erythromycin durchgeführt. Für Erwachsene gelten außerdem eine stattgehabte Pneumokokkeninfektion und zu erwartender schlechter Impferfolg (z.B. unter

Chemotherapie) als Kriterien für eine längerfristige Antibiotikaeinnahme. Außerdem erhalten Patienten eine Stand-by-Medikation, mit welcher sie bei Fieber, Schüttelfrost oder Krankheitsgefühl umgehend und eigenständig eine Antibiotikatherapie einleiten können, noch bevor schnellstmöglich ein Arzt aufgesucht wird (Engelhardt et al., 2013).

Zusätzlich zu den genannten Infektionen gelten auch Tierbisse als potenziell gefährdend und bedürfen einer umgehenden ärztlichen Konsultation.

Bei Auslandsaufenthalten muss weiterhin an parasitäre Infektionen (z.B. Malaria) gedacht und entsprechende Präventionsmaßnahmen überdacht werden (Engelhardt et al., 2013).

Neben Infektionen gelten Thrombosen als gefürchtete Komplikation nach Splenektomie. Das Risiko eines thromboembolischen Ereignisses variiert je nach Indikation zur Splenektomie: während eine Splenektomie infolge einer traumatischen Milzruptur ein erhöhtes Thromboserisiko im Vergleich zu Nicht-Splenektomierten aufweist, gilt ein *d e u t l i c h* erhöhtes Risiko für Patienten mit hämolytischen Grunderkrankungen, insbesondere der Thalassämia intermedia (Crary und Buchanan, 2009).

Peri- und postoperative Thromboseprophylaxe sowie regelmäßige Verlaufskontrollen nach Splenektomie insbesondere zum Ausschluss einer Pfortaderthrombose mittels Doppler-Sonographie und D-Dimer-Bestimmung sind dringend indiziert (Engelhardt et al., 2013).

Obwohl die Milz durchaus klinische Relevanz besitzt, ist es erstaunlich, dass die histologische Terminologie für menschliche Milzen viele Mängel aufweist. Sie berücksichtigt organspezifische Besonderheiten nicht oder weist sogar Fehler auf. Die Terminologie ist offenbar von Ratten und Mäusen abgeleitet worden. Sie ist jedoch auch im Hinblick auf diese Spezies nicht aktuell. Aus diesem Grund wird in der vorliegenden Arbeit versucht, mit immunhistologischen Methoden die wesentlichsten Strukturen in der Milz von Ratten darzustellen.

1.3 Die Milz bei Ratten

1.3.1 Ratten als Versuchstiere

Alle Wirbeltiere verfügen über eine Milz. Am meisten untersucht wurde sie jedoch bei Mensch, Maus und Ratte (Steiniger, 2015).

Ratten gelten allgemein als sehr robuste Tiere, welche auch unter suboptimalen Lebensbedingungen überleben können. Während Ratten normalerweise problemlos operative Eingriffe unter unsterilen Bedingungen überstehen, konnte ebenfalls eine erhöhte Anfälligkeit für Infektionen nach Splenektomie festgestellt werden: In einer 1980 publizierten Studie (Moxon et al., 1980) war von 80 Ratten die eine Hälfte splenektomiert worden; bei der anderen Hälfte war lediglich die Bauchhöhle eröffnet worden – ohne Organentnahme. Die Tiere wurden intravenös oder intranasal mit dem Erreger *Haemophilus influenzae* Typ B infiziert. Bei 47% der splenektomierten Ratten traten in der Folge Meningitiden auf, während in der Kontrollgruppe Erreger nachgewiesen werden konnten, aber kein Tier erkrankte.

Zu Beginn des 20. Jh. wurden Ratten als Versuchstiere immer beliebter; 1906 begann das Wistar Institute for Anatomy and Biology der University of Pennsylvania als erstes Institut mit der Züchtung von Laborratten, den sogenannten „Wistar-Ratten“ (Biermann, 2011).

Ratten galten lange als Versuchstiere der Wahl: bis zur ersten knock-out-Maus 1989 existierten 70% mehr Publikationen über Ratten als über Mäuse. Forschungshistorisch steht die Ratte gegenüber der Maus an 1. Stelle (Iannaccone und Jacob, 2009; Gibbs et al., 2004).

Wistar-Ratten sind aus der Art *Rattus norvegicus* (Wanderratte) gezüchtet und können ein Körpergewicht von 200 – 400g erreichen, was ein 10-Faches des Körpergewichts einer Maus darstellt. Dies ermöglicht zum einen erleichterte optische Bedingungen bei der Gewinnung von Proben, wie auch zum anderen quantitativ mehr und größeres Probenmaterial. Auch für vaskularisierte experimentelle Organtransplantationen eignen sich die im Vergleich zu Mäusen

deutlich größeren Organe bei Ratten besser.

Insbesondere für kardiovaskuläre Untersuchungen bieten Ratten mit einer Herzfrequenz von ca. 300 bpm bessere physiologische Bedingungen als Mäuse (ca. 600 bpm). Auch für verhaltensbiologische Untersuchungen gelten Ratten aufgrund ihres Empathie- und Lernvermögens gegenüber Mäusen als überlegen.

Nicht zuletzt durch den Besitz von 2,75 Milliarden Basenpaaren stehen Ratten rein zahlenmäßig in ihrer DNA dem Menschen näher (Mensch: 3,27 Milliarden, Maus: 2,6 Milliarden; Iannaccone und Jacob, 2009; Gibbs et al., 2004).

Mit den Möglichkeiten der Gen-Manipulation an Mäusen verloren Ratten an Beliebtheit unter den Versuchstieren, da die Herstellung von transgenen oder knockout-Ratten erheblichen Schwierigkeiten unterlegen war.

Bei der seit 2012 etablierten Methode des Gene Editing oder CRISPR/Cas9 sind embryonale Stammzellen nicht vonnöten: künstlich hergestellte RNA, welche für ein Protein namens Cas9 und eine beliebige Erkennungssequenz kodiert, wird in eine Zelle geschleust. Das Cas9-Protein wird in der Zelle hergestellt und ist in der Lage DNA-Doppelstrangbrüche anhand der ihm beigefügten Erkennungssequenz gezielt durchzuführen. So ist es möglich, in jedem beliebigen Genom – pflanzlich, tierisch und human – Gensequenzen auszuschneiden, einzufügen oder punktuell zu verändern (Doudna und Charpentier, 2014).

Mit dieser bahnbrechenden Entwicklung ist davon auszugehen, dass in Zukunft Ratten wieder ihre Vorreiterrolle bei den Versuchstieren zurückgewinnen werden.

Aus diesem Grund soll in der vorliegenden Dissertation der Fokus auf den Feinbau der Rattenmilz gelegt werden. Besonders hervorgehoben werden muss auch, dass die Terminologie der Milzkompartimente zuerst für Ratten festgelegt worden ist (Snook, 1964). Eine differenzierte spezies-spezifische Betrachtung ist dabei wichtig, um falsche Analogieschlüsse auf den Menschen zu verhindern. In der Vergangenheit wurden neue Erkenntnisse bei verschiedensten Spezies zum Aufbau der Milz unkritisch „in einen Topf“

geworfen, während es bereits unter den nahe verwandten Nagetieren – Maus und Ratte – erhebliche Unterschiede gibt.

Im Folgenden soll nun ein Überblick über den mikroskopischen Aufbau der Milz von Ratten gegeben werden.

1.3.2 Mikroskopischer Aufbau der Milz bei Ratten

Der Mensch mag zunächst nicht viele Gemeinsamkeiten mit einem kleinen Nagetier wie der Ratte aufweisen; makro- und mikroskopischer Aufbau der Milzen beider Spezies zeigen jedoch einen sehr ähnlichen Grundbauplan. Während Ratten im Vergleich zum Menschen beispielsweise weder Gallenblase noch Tonsillen besitzen, sind die makroskopischen Gegebenheiten der Milz ähnlich: sie befindet sich bei Ratten ebenfalls im linken Oberbauch, kaudolateral zum Magen gelegen, mit welchem sie über das Lig. gastrolienale verbunden ist. Mit dem Zwerchfell steht sie über das Lig. phrenicolienale in Verbindung (Salomon and Achilles, 2008). Beide Ligamente kommen auch beim Menschen vor.

Umhüllt wird das weiche Milzgewebe von einer festen, bindegewebigen Kapsel, von welcher Stränge, sogenannte Milztrabekel, ins Organinnere ziehen und die Milz in Segmente unterteilen.

Das Organgewebe der Milz besteht aus verschiedenen Arten von retikulärem Bindegewebe, das ständig von Lymphozyten durchwandert wird. Dabei werden zwei Bereiche morphologisch und funktional unterschieden: die Rote und die Weiße Pulpa. Die Weiße Pulpa (WP) ist gekennzeichnet durch das überwiegende Vorkommen von B- und T-Lymphozyten, die an der Oberfläche arterieller Gefäße jeweils durch definierte Bindegewebsregionen wandern. In der Roten Pulpa (RP) werden Erreger oder überalterte / deformierte Erythrozyten durch RP-Makrophagen eliminiert – damit ist die RP das wahrscheinlich effektivste Phagozytosekompartiment des Körpers.

Im Folgenden sollen die Milzkompartimente bei Ratten genauer beschrieben werden.

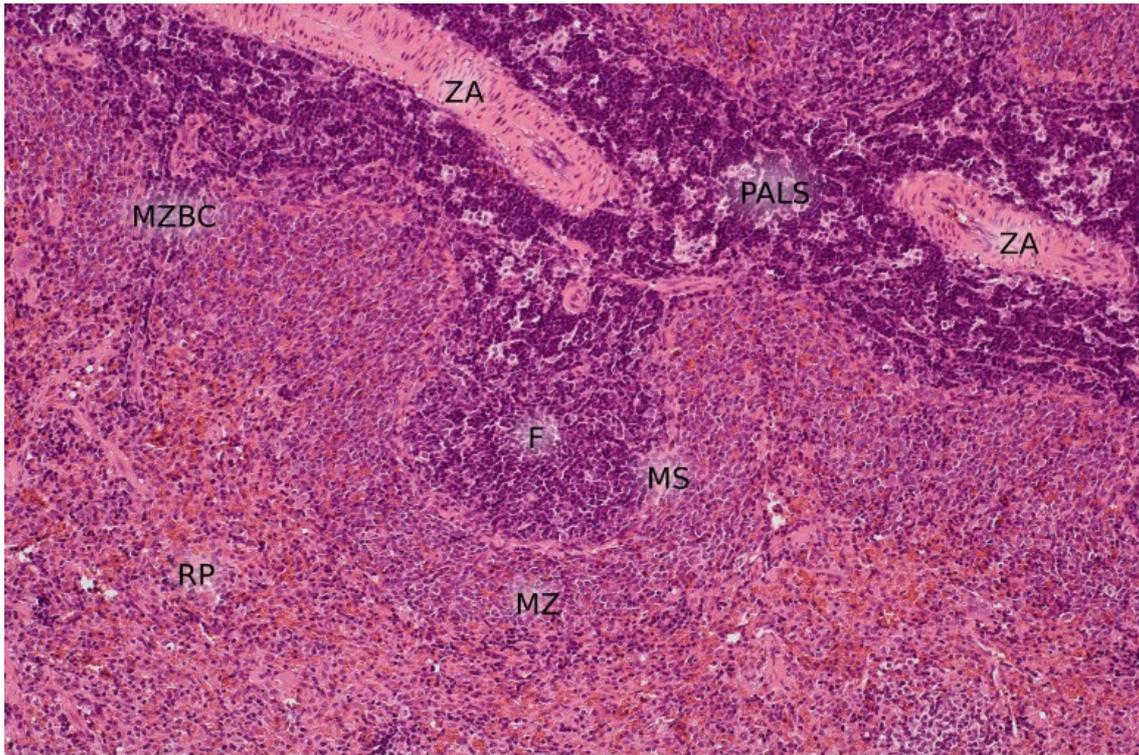


Abbildung 1a: Kompartimente in der Rattenmilz. HE-Färbung. (F) Follikel (ohne Keimzentrum), (MS) Marginalsinus, (MZ) Marginalzone, (PALS) Periarterielle lymphatische Scheide, (ZA) Zentralarterie, (RP) Rote Pulpa, (MZBC) Marginal zone bridging channel.

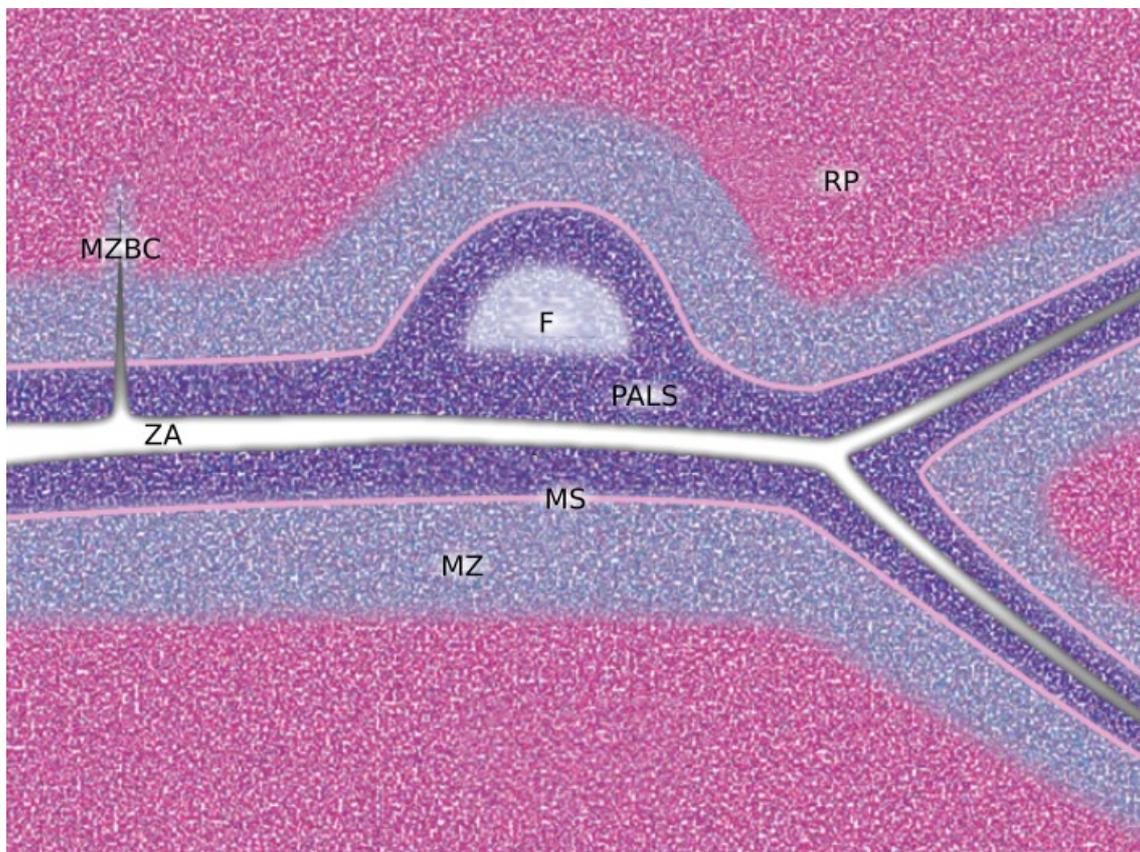


Abbildung 1b: Schematischer Aufbau der Milz bei Ratten (in Anlehnung an: Steiniger, 2015). (RP) Rote Pulpa, (F) Follikel, (PALS) Periarterielle lymphatische Scheide, (MZBC) Marginal zone bridging channel, (ZA) Zentralarterie, (MS) Marginalsinus, (MZ) Marginalzone.

Rote Pulpa:

Die RP besteht aus blutgefüllten Bindegewebssträngen, den (Billroth-) Milzsträngen, die zwischen Gefäßgeflechten liegen. Die Milz wird über die A. splenica mit Blut gespeist, welche bei Ratten geradewegs durch das intraperitoneal gelegene Pankreas verläuft und sich in diesem Organ in mehrere Endäste ins Milzhilum aufzweigt (Hebel und Stromberg, 1986). Noch vor Eintritt am Hilum teilt sich die Milzarterie in mehrere Äste auf. Sobald die Äste die Milztrabekel erreichen, verzweigen sie sich weiter als sogenannte Trabekelarterien. Nach mehrfacher Aufzweigung erreichen sie das Parenchym und werden nun als Zentralarterien bezeichnet. Kennzeichnend für diese ist das Fehlen von parallel verlaufenden Begleitvenen, welche in allen zuvor genannten Abschnitten vorkommen. Neben Zentralarterien findet sich ein Sammelsorium diverser Blutgefäßabschnitte in der RP: Arteriolen, Kapillaren, Sinus, Venulen, und Venen. Sinus bilden den Beginn des venösen Gefäßabschnitts, stellen aber einen eigenen milzspezifischen Gefäßabschnitt dar. Sinusendothel ist spezies-spezifisch und verfügt über Lücken zwischen den Endothelzellen (diskontinuierliches Endothel). Die Sinus sind über Ringfasern aus Kollagen Typ IV und Laminin im Gewebe verankert. Das Sinusendothel von Ratten enthält Aktin- und Vimentin-Filamente, welche die Endothelzellen an den extrazellulären Ringfasern verankern (Uehara und Uehara, 2010).

Die Milz ist das einzige Organ, dessen Vaskularisation bislang nicht hinreichend aufgeklärt werden konnte. In einer szintigrafisch gestützten Studie an Ratten konnte mithilfe der Verfolgung radioaktiver Marker gezeigt werden, dass der Blutfluss in der Milz nicht kontinuierlich und der venöse Rückstrom langsam und unregelmäßig verläuft (Rodrigues et al., 2014). Mithilfe von 3D-Rekonstruktionen von Serienschnitten der humanen Milz konnte die fehlende Gefäßkontinuität aufgezeigt werden (Steiniger et al., 2011).

Diese Beobachtungen legen nahe, dass die Milzen von Mensch und Ratte über ein offenes Kreislaufsystem verfügen: Blut verlässt über die offenen Enden von Kapillaren in der Roten Pulpa das Gefäßsystem und nimmt seinen Weg frei durch das retikuläre Gewebe der RP, bis es zur venösen Drainage wieder in den sogenannten Sinus gesammelt wird und von dort Anschluss an den venösen Schenkel gewinnt (Steiniger et al., 2011). Im Gegensatz zu Menschen existieren bei Ratten jedoch bisher keine detaillierten Untersuchungen zu

diesem Vorgang. Ungeklärt bleibt bisher auch, wie die Blutgerinnung bei Kontakt von Blut mit dem retikulären RP-Bindegewebe unterbunden wird, sowie die Frage, wie das Blut ohne offensichtliche Leitstruktur zu den Sinus findet.

In der RP versammeln sich außerdem alle im Blut vorhandenen Zellen: Erythrozyten, Thrombozyten, Leukozyten und Plasmazellen. Durch eine große Anzahl an RP-Makrophagen, welche sich um Sinus aufhalten und über ihr diskontinuierliches Endothel ein- und auswandern können, wird effektiv Phagozytose betrieben. Das offene Mikrozirkulationssystem gewährleistet dabei eine kontinuierliche Belieferung mit Blut und zu eliminierenden Antigenen direkt vor die Membranen der RP-Makrophagen.

Fibroblasten produzieren das retikuläre Bindegewebe der RP. Derzeit ist aber noch immer unklar, wie sie die Koagulation des Blutes verhindern. Über den Phänotyp der Fibroblasten in der RP von Ratten ist im Vergleich zum Menschen bisher nur wenig bekannt (van den Berg et al., 1989).

Weißer Pulpa:

Bei Ratten überwiegt der Anteil der WP gegenüber dem Anteil an RP. Trotz spezifizierter pathogenfreier Haltung zeigen die Tiere interindividuelle Unterschiede in den Ausprägungsmustern ihrer WP (Steiniger and Barth, 2000). Die WP lässt sich bei Ratten in drei Kompartimente aufteilen: Periarterielle lymphatische Scheide (PALS), Follikel und Marginalzone (MZ) (Veerman and van Ewijk, 1975).

Bei der PALS handelt es sich um konzentrische Ansammlungen von überwiegend T-Lymphozyten um Zentralarterien, die durch ein Netzwerk ortsständiger fibroblastischer Retikulumzellen (FRCs) wandern. Die äußere PALS-Region stellt ein Wanderungskompartiment für rezirkulierende B-Lymphozyten und Plasmablasten dar, das Anschluss an die Mantelzone der Follikel hat. Vermutlich können die wandernden B-Zellen dort antigen-spezifische Interaktionen mit T-Zellen initiieren. Die Plasmablasten in der äußeren PALS-Region könnten aus den Keimzentren von Milzfollikeln stammen oder in der äußeren PALS generiert werden.

Neben den FRCs kommen in der PALS auch Interdigitierende dendritische Zellen (IDCs) und Makrophagen vor. Bislang konnte nicht geklärt werden, um

welchen Gefäßtyp die PALS-Region endet.

Follikel sind halbkugelförmige Ansammlungen wandernder B-Lymphozyten, die der PALS in relativ weiten, aber regelmäßigen Abständen anliegen. Durchschnittlich haben die Follikel einen Durchmesser von 300 – 500 µm und enthalten follikuläre dendritische Zellen (FDCs) als ortsständige Zellen (Steiniger, 2015). Follikel können als Primärfollikel auftreten, die keine spezielle Innenstruktur haben oder als Sekundärfollikel mit einem hellen Keimzentrum im Inneren. Ein Keimzentrum besteht aus einer dunklen und einer hellen Zone, wenn es vollständig entwickelt ist. In beiden Zonen befinden sich proliferierende antigenspezifische B-Lymphozyten, wobei die Dichte dieser Zellen in der dunklen Zone sehr viel höher ist als in der hellen. Die B-Lymphozyten der dunklen Zone werden als Zentroblasten, die der hellen Zone als Zentrozyten bezeichnet. Das Keimzentrum liegt asymmetrisch in einer Mantelzone, die aus kleinen wandernden B-Lymphozyten besteht. Die Mantelzone entspricht dem nach außen verdrängten Rest eines Primärfollikels.

Die Funktion von Keimzentren wurde bisher überwiegend an Mäusen untersucht. Die grundlegenden Prinzipien dürften jedoch auch bei Ratten sehr ähnlich sein. Die Bildung von Keimzentren ist ein sekundäres Phänomen bei B-Zell-vermittelten Immunreaktionen: wenn B-Lymphozyten erstmalig außerhalb von Follikeln mit ihrem Antigen konfrontiert werden und gegebenenfalls Hilfe von T-Lymphozyten erhalten, differenzieren die B-Zellen extrafollikulär zu Plasmazellen aus, die niedrigaffine Antikörper der IgM-Klasse sezernieren. Die Plasmazellen sind kurzlebig; ihr sezerniertes Immunglobulin bildet aber mit löslichem Antigen Immunkomplexe, die – abhängig von ihrer Größe – entweder auf direktem Weg oder an Makrophagen bzw. B-Lymphozyten gebunden in die Follikel gelangen. Diese Immunkomplexe werden auf der Oberfläche von FDCs deponiert und zyklisch von diesen endozytiert. Es ist bekannt, dass Immunkomplexe auf FDCs monatelang, eventuell auch lebenslang, persistieren können. Ein Keimzentrum entsteht nun auf folgende Weise: Rezirkulierende B-Lymphozyten interagieren an der Oberfläche der PALS mit T-Helferzellen und erreichen in vorstimuliertem Zustand die Follikel. Wenn diese B-Lymphozyten im Follikel mit ihrem Oberflächen-Immunglobulin die passende Bindungsstelle in einem Antigen (ein sogenanntes Epitop) erkennen, welches in den

Immunkomplexen auf FDCs vorkommt, werden sie im Follikel arretiert. Die B-Zellen übernehmen das Antigen mithilfe ihres Oberflächen-Immunglobulins von den FDCs, endozytieren es und zerlegen es intrazellulär in Peptide. Diese antigenen Peptide werden dann intrazellulär an MHC-Klasse-II-Moleküle gebunden und zusammen mit diesen zur Zellmembran der B-Lymphozyten transportiert. Dort werden die Peptide antigenspezifischen follikulären T-Helferzellen in der Peptid-Bindungsgrube der MHC-Moleküle präsentiert. Die B-Lymphozyten erhalten dann je nach Menge der präsentierten Peptide Hilfe von diesen T-Helferzellen. Die Hilfe besteht sowohl aus direkten Interaktionen von Membranmolekülen auf B- und T-Lymphozyten wie auch aus der Sekretion von löslichen Zytokinen durch T-Helferzellen. Je mehr antigene Peptide ein B-Lymphozyt präsentieren kann, desto mehr Hilfe bekommt er von follikulären T-Helferzellen. Aus diesem Grund konkurrieren die antigenspezifischen B-Lymphozyten in Follikeln um die Hilfe von T-Helferzellen. Die antigenspezifisch arretierten B-Lymphozyten ordnen sich zentral im Primärfollikel an, beginnen sich zu teilen und bilden ein Keimzentrum. Nach einiger Zeit entwickelt sich im Keimzentrum eine dunkle und eine helle Zone. Dabei beginnt die Proliferation der B-Zellen in der hellen Zone. Die Zellen wandern dann in die dunkle Zone und setzen dort als Zentroblasten die Proliferation fort. In der dunklen Zone kommt es zu Punktmutationen in den antigenbindenden Abschnitten des Oberflächen-Immunglobulins, sodass dieses anschließend besser, schlechter oder unverändert binden kann. Die Zellen werden dann zu Zentrozyten und nehmen in der hellen Zone Antigen aus Immunkomplexen auf FDCs auf. Zentrozyten, die per Zufall durch Punktmutation ein besser zum Antigen (Epitop) passendes Oberflächen-Immunglobulin tragen, können mehr Antigen aufnehmen und präsentieren. Damit erhalten diese Zentrozyten mehr Hilfe von follikulären T-Helferzellen, während weniger affine B-Zellen mangels T-Zell-Hilfe durch Apoptose zugrunde gehen. Hierdurch werden höher affine B-Zellen positiv selektioniert. Die B-Zellen bewegen sich offenbar mehrfach von der hellen zur dunklen Zone und zurück („cyclic re-entry“-Hypothese). Dies führt zu mehreren Mutationsschritten (Hypermutation) im antigenbindenden Bereich des Oberflächen-Immunglobulins und durch anschließende Selektion der B-Zellen zur Affinitätsreifung des Oberflächen-Immunglobulins. Mit der Affinitätsreifung ist schließlich ein Wechsel der Immunglobulin-Klasse verbunden. Beides wird

durch das Enzym AID (activation induced deaminase) gesteuert. Bisher nicht vollständig bekannte Stimuli führen anschließend dazu, dass die B-Lymphozyten entweder zu Plasmablasten oder B-Gedächtniszellen werden. Zusammenfassend läuft somit eine Vermehrung antigenspezifischer B-Lymphozyten ab, bei der sich die Affinität des Oberflächen-Immunglobulins erhöht und die Immunglobulinklasse gewechselt wird. Zusätzlich reifen die hochaffinen B-Lymphozyten in Keimzentren zu Plasmazell-Vorläufern aus, während sich die weniger affinen Zellen zu B-Gedächtniszellen entwickeln. Beide Zellarten verlassen das Keimzentrum und verteilen sich auf dem Blutweg im Körper.

Ärmelartig umgeben werden PALS und Follikel von der Marginalzone (MZ), welche bei Ratten in besonders beeindruckender Ausprägung in Erscheinung tritt. Diese Zone wurde erstmals durch Weidenreich 1901 als „Knötchenrandzone“ in der menschlichen Milz beschrieben und nach mehreren unterschiedlichen Begrifflichkeiten unter dem Terminus „Marginalzone“ durch Snook geprägt (Snook, 1964). Die MZ besteht im Wesentlichen aus einer besonderen B-Lymphozyten-Subpopulation, welche sich phänotypisch von den B-Lymphozyten in der Mantelzone von Follikeln unterscheidet: MZ-B-Zellen sind größer als die B-Lymphozyten der Mantelzone und besitzen einen helleren Kern. Sie exprimieren Oberflächen IgM, jedoch - im Gegensatz zu Mantelzonen B-Lymphozyten - nur wenig IgD und sind CD23 negativ.

Bei den MZ-B-Zellen soll es sich um B-Gedächtniszellen handeln. Die Klassifikation dieser B-Zellen ist bei Ratten jedoch nicht völlig klar (Hendricks et al., 2011). Auch die Frage, ob diese Zellen wandern oder sesshaft sind, ist bei Ratten ungeklärt. An einigen Stellen wird die MZ durch nahezu in rechtem Winkel verlaufende Seitenäste der Zentralarterien unterbrochen. Es handelt sich dabei um sogenannte „marginal zone bridging channels“, welche eine Wanderung von Lymphozyten und einer Makrophagen-Subpopulation von der Weißen in die Rote Pulpa erlauben und umgekehrt (Mitchell, 1973). Die Wanderung von Zellen in den Channels funktioniert in beide Richtungen. Möglicherweise dient diese „Abkürzung“ Lymphozyten und Plasmablasten dazu, in die RP zu gelangen, um dort weiterzuwandern bzw. zu Plasmazellen zu differenzieren.

Neben Lymphozyten kommen MZ-Makrophagen (MZM) vor. Aufgrund des Vorkommens von Lymphozyten gehört die MZ definitionsgemäß zur Weißen Pulpa. Es werden aber auch zahlreiche Erythrozyten in dieser Zone beobachtet, sodass die MZ auch als ein Teil des offenen Mikrozirkulationssystems in der Milz und damit als ein Teil der Roten Pulpa gesehen werden kann.

Zur Milzoberfläche haben die Gefäße eine zunehmend dünnere MZ. Die MZ endet schließlich in der Umgebung kleinerer Arterien unter der Milzkapsel.

Während die äußere Grenze der MZ mit Verlauf in Richtung RP nicht eindeutig zu bestimmen ist, existiert eine scharfe Trennung zu Follikeln und PALS durch das Vorhandensein einer blutgefüllten Spalte, des Marginalsinus (Snook 1964). Es konnte gezeigt werden, dass eine Permeabilität auch für größere Moleküle vom Marginalsinus (MS) in die MZ, nicht aber in die PALS und die Follikel besteht. Diese Permeabilität wird durch ein diskontinuierliches Endothel zur Seite der MZ gewährleistet (Sasou et al., 1976). Der MS stellt somit keine unüberwindbare Barriere dar; vielmehr wird vermutet, dass Erythrozyten, Thrombozyten und Lymphozyten möglicherweise über den MS Zutritt zur MZ haben (Veerman and van Ewijk, 1975).

Zwischen Marginalsinus und PALS bzw. Follikeln kommt eine weitere Makrophagen-Subpopulation vor: die Marginalen Metallophilen Makrophagen (MMM). Es wird vermutet, dass MMM hochmolekulare Substanzen am Eintritt in PALS- / Follikelregionen hindern (Nolte et al., 2003).

Bei Ratten exprimieren beide Makrophagenarten – MZM und MMM – u.a. CD169 (Sialoadhäsion) (Dijkstra et al., 1985).

Die speziellen Bindegewebszellen der MZ sind bei Ratten und Mäusen bisher unbekannt.

Lymphozytenrezirkulation:

Wahrscheinlich existieren zwei unterschiedliche Rezirkulationswege: Zum einen gelangen Lymphozyten über den MS in die MZ. Von dort aus wandern T-Zellen auf direktem Wege zur PALS; B-Zellen erreichen die Follikel über die äußere PALS.

Bei der anderen Rezirkulationsvariante nutzen die Lymphozyten einen retrograden Migrationsweg über Arteriolen in der RP. Dieser vermutlich zeitlich intensivere Weg nutzt die marginal zone bridging channels, damit B- und T-

Zellen ihre entsprechenden Kompartimente erreichen können. Diese Erkenntnisse wurden mithilfe von radioaktiv markierten, intravenös verabreichten Lymphozyten gewonnen (van Ewijk and van der Kwast, 1980).

Ebenso unvollständig geklärt wie die Wege in die Milzkompartimente sind aktuell ebenfalls die Wege aus der Milz heraus in die Blutbahn. Im Gegensatz zu afferenten existieren efferente Lymphgefäße, welche von einem Teil der Lymphozyten genutzt werden. Desweiteren gibt es vermutlich einen konstanten Efflux an Zellen über den offenen Milzkreislauf. Auch hier scheinen MZ bridging channels den auswandernden Lymphozyten als Leitstrukturen zu dienen (Khanna et al., 2007).

In der vorliegenden Arbeit sollen Stromazellen, B- und T-Lymphozyten sowie Plasmablasten, Granulozyten, Erythrozyten, Makrophagen und Komponenten der Extrazellulärmatrix in der Milz des Ratten-Inzuchtstamms LEW immunhistologisch dargestellt werden. Spezielles Ziel ist es, die MZ der Weißen Pulpa im Hinblick auf die erwähnten Zellarten zu untersuchen und sie mit dem bekannten Aufbau der oberflächlichen weißen Pulpa bei Menschen und Mäusen zu vergleichen. Es soll insbesondere geklärt werden, ob die Marginalzone zum offenen Kreislaufsystem der Milz gehört und ob es in diesem Kompartiment spezialisierte Stromazellen gibt.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Versuchstiere und Organe

Bei den Organen handelt es sich um Milzpräparate von 9 männlichen Ratten des Inzuchtstammes „Lewis“. Fünf dieser Tiere stammen von der Firma Janvier (LEW/OrlRj), vier weitere aus dem Zentralen Tierlabor der Medizinischen Hochschule Hannover (LEW/ZTL). Die Ratten wurden unter spezifiziert pathogenfreien (SPF) Bedingungen gezüchtet und im Alter von 9 – 14 Wochen getötet. Jedes Antigen wurde jeweils an einem Tier untersucht. Eine Ausnahme bildete die Doppelfärbung für MIB-5 und IgM, die an sechs Tieren durchgeführt wurde. In diese Serie wurde zum Vergleich auch ein 17 Wochen altes Tier aus dem Zentralen Tierlabor der MHH eingeschlossen, das unter konventionellen Bedingungen gehalten wurde. Es handelte sich um Organe von unbehandelten Kontrolltieren aus Tierversuchen mit folgenden Genehmigungen: II 25.3-19c20/15 (1) MR4-5/93; II 25.3-19c20/15 MR20/26-Nr 05/98; V54-19c20/15 MR20/26 Nr 06/2005; V54-19c20-15(1) MR20/26 Nr 46/2010.

2.2 Aufarbeitung der Milzen – Vom Organ zum Schnittpräparat

Je nach histologischer Fragestellung kann es sinnvoll sein, mit alkoholfixierten Gefrierschnitten („Cryoschnitten“) oder mit Schnitten von Organen zu arbeiten, die in Formalin/H₂O fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet wurden („Paraffinschnitten“): Um Membran-Antigene nachzuweisen, werden Cryoschnitte oder, falls möglich, Paraffinschnitte verwendet. Für intrazelluläre Antigene müssen Paraffinschnitte genutzt werden, da intrazelluläre – und damit lösliche – Antigene in alkoholfixierten Cryoschnitten leicht ausgewaschen werden.

Problematisch sind Transkriptionsfaktoren (z.B. Ki67), welche zwar cryogängig, aber besser darstellbar auf Paraffinschnitten sind. Die meisten unserer Antikörper sind vor der Ära der Immunhistologie auf Paraffinschnitten entwickelt worden und sind nur auf Cryoschnitten einsetzbar. Damals war noch nicht bekannt, dass formalin-fixierte Gewebeschnitte vor der immunhistologischen Färbung eine Antigendemaskierung benötigen.

Für eine schnelle Fixierung werden die Milzen zunächst in Scheiben mit maximal 3 mm Dicke zugeschnitten.

Zur Anfertigung von Cryoschnitten werden die Scheiben in flüssigem Stickstoff (- 196°C) schockgefroren und anschließend bei - 80°C in verschlossenen Röhrchen aufbewahrt. Bei Bedarf können nun mit einem tiefgekühlten Rotationsmikrotom (Cryostaten) Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgezogen werden. Die Schnitte können gut verpackt bei - 20°C für einige Monate gelagert werden.

Zur Herstellung von Paraffinschnitten werden die Scheiben für 24 h in 3,7% Formaldehyd in Leitungswasser fixiert. Nach Einbettung in Paraffin können Schnitte angefertigt werden, welche nach Streckung im 30°C warmen Wasserbad auf Objektträger aufgezogen werden.

Durchschnittlich haben Paraffinschnitte eine Dicke von 5-7µm, Cryoschnitte von 10 µm.

Zur Haftungsverbesserung werden die Objektträger zuvor mit 2%igem Silan (3-Aminopropyl-Triethylsilane) vorbehandelt.

2.3 Immunhistochemie

Mit dem Aufkommen der monoklonalen Antikörper in den 1980er Jahren etablierte sich eine Methode zur gezielten Detektion von definierten Molekülen in Geweben. Dabei macht man sich die spezifische Antigen-Antikörper-Bindung zunutze: Im optimalen Fall bindet ein monoklonaler Antikörper gezielt ein Epitop. Dank monoklonaler Antikörper sind identische AK unbegrenzt herstellbar.

Mit der Zeit entwickelten sich verschiedene Färbemethoden, bestehend aus Peroxidase-gekoppelten Systemen und einem Chromogen, welche das Antigen schließlich sichtbar machen. Dabei kann die Peroxidase direkt an den Antikörper gekoppelt sein („direkte Nachweismethode“). Eine vielseitigere Alternative ergibt sich bei der „indirekten Nachweismethode“, bei der die Peroxidase an ein spezie-spezifisches Anti-Immunglobulin („Sekundärantikörper“) gebunden vorliegt. Der gleiche Sekundärantikörper ist deshalb in der Lage, an verschiedene Primärantikörper zu binden. Dadurch

entfällt die separate Konjugation der Peroxidase an die Primärantikörper, und es wird eine höhere Verstärkung des Antigen-Nachweises bewirkt.

Eine besonders hoch verstärkende Methode ist die Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC-Methode) (s. Abb. 2). Sie verwendet Sekundär-Antikörper, die mit Biotin konjugiert sind. Beim Nachweis werden präformierte Komplexe aus Avidin und biotinylierter Peroxidase hergestellt, die noch freie Biotin-Bindungsplätze besitzen. Da Avidin 4 hochaffine Bindungsstellen für Biotin besitzt (ABC-Komplexe), lagern sich die ABC-Komplexe im letzten Schritt des Nachweises an den Sekundärantikörper an. Dies bewirkt aufgrund der Komplexgröße eine enorme Verstärkung durch Vermehrung der Peroxidase-Moleküle.

Die ABC-Methode nutzt den Vorteil der indirekten Nachweismethode und kombiniert sie mit einer höheren Menge an Peroxidase vor Ort (durch das Ausbilden von Komplexen) sowie einer deutlich gesteigerten Affinität, welche sich aus den besonderen physikalischen Eigenschaften von Biotin und Avidin ergibt. So kann das Eiweißglykoprotein Avidin vier Moleküle des Vitamins Biotin binden und trägt damit zu der höheren Empfindlichkeit dieser Methode bei.

Die ABC-Methode ist allerdings nicht das einzige Nachweissystem, welches im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde. Weitere Nachweismethoden werden in *Kapitel 2.5.5 Sekundärantikörper und Nachweis* ergänzend vorgestellt.

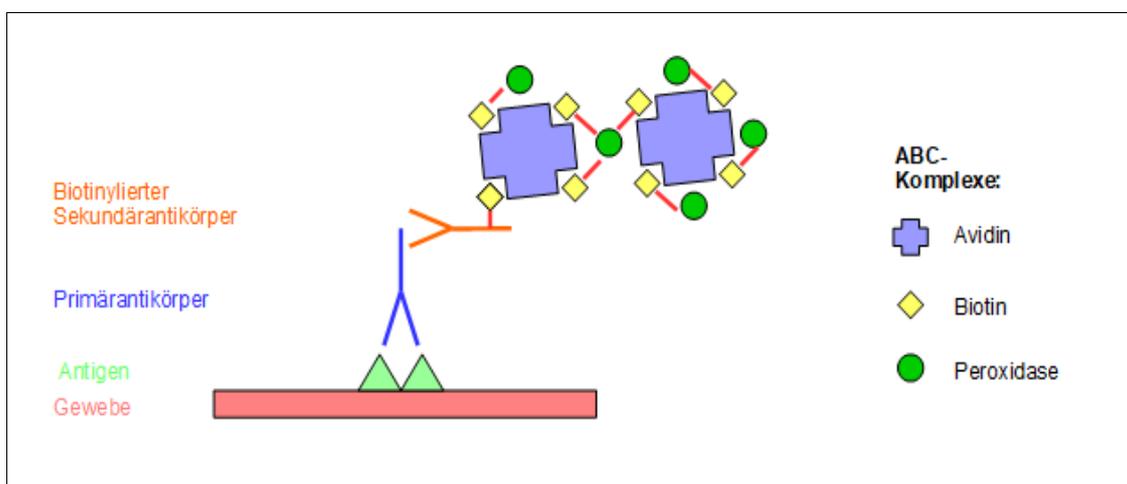


Abbildung 2: ABC-Methode – Schematische, stark vereinfachte Darstellung.

Ein Primärantikörper bindet an sein spezifisches Antigen. Ein biotinylierter Sekundärantikörper bindet an den Primärantikörper. Die Peroxidase, welche die Farbreaktion auslöst, ist biotinyliert und liegt als großer Komplex mit vielen Avidin-Molekülen vor. Dadurch wird eine höhere Empfindlichkeit des Nachweises ermöglicht.

2.4 Primär- und Sekundärantikörper

Tabelle 1: Primärantikörper für Einfachfärbungen

AK	Antigen	Verd.	Hersteller (mit Bestellnr.)	Referenz
1A29	CD54/ICAM-1	1: 640	Serotec (via Biozol) (MCA773)	(Tamatani and Miyasaka, 1990)
5F10	CD106/VCAM-1	1: 80	R. Lobb (Fa. Biogen) (keine Nr. vorhanden)	(Sanz et al., 1998)
a-Lam. ^{a)}	Pan-Laminin	1:10.000	Abcam (ab11575)	(Berg et al., 1989)
asm-1	SMA	1:320-640	Progen (61001)	(Skalli et al., 1986)
ED2	CD163	1: 200	Serotec (via Biozol) (MCA342)	(Dijkstra et al., 1985)
ED3	CD169	1: 640	Serotec / C. Dijkstra (MCA343R)	(Dijkstra et al., 1985)
His49 ^{c)}	Erythrozyten	1: 40	IQ Products (via DPC Biermann) (IHC-321)	(Hermans and Opstelten, 1991)
His52	RECA-1	1:200-300	A. Duijvestijn (Fa. Medac) (HIS52)	(Duijvestijn et al., 1992)
His57	unbekannt	1:100-1000	Nieuwenhuis/Kroese (via BD Pharmingen) (559960)	(Dammers et al., 1999) (Dammers et al., 2000) (Peter M. Dammers and Kroese, 2005) (Hendricks et al., 2011)
IgM ^{b)}	IgM	1:3.000	Biodesign (W90338C)	
MARD-3	IgD	1:1.000	H. Bazin / Biozol (BZL05256)	(Bazin et al., 1978) (Peter M. Dammers and Kroese, 2005)
MIB-5	Ki-67		J. Gerdes (keine Nr. vorhanden)	(Gerlach et al., 1997)
Ox8	CD8, alpha-Kette	1:1.600	Pharmingen (22071D)	(Brideau et al., 1980)
Ox33	CD45RA	1: 800	Serotec (via Biozol) (MCA340G)	(Woollett et al., 1985)
Ox34	CD2	1: 640	Serotec (keine Nr. vorhanden)	(Jefferies et al., 1985)
Ox43	unbekannt	1: 800	Serotec (via Biozol) (MCA276G)	(Robinson et al., 1986)
R73	TCR	1:400-800	T. Hünig / Pharmingen (22281D)	(Hünig et al., 1989)
RP-1	N. Granulozyten	1:500-1000	F. Sendo, Yamagata Univ., Japan (keine Nr. vorhanden)	(Gotoh et al., 1986)

Standard-Nachweissystem: ABC mit anti-mouse Sekundärantikörper.

^a rabbit anti-rat laminin, Nachweis mit ABC anti-rabbit IgG

^b sheep anti-rat IgM, Nachweis mit donkey anti-sheep IgG (Peroxidase-konjugiert)

^c mouse IgM, Nachweis mit ABC anti-mouse IgM

Für eine orientierende Überprüfung der Primärantikörper wurden zunächst stets Einfachfärbungen an Cryo- oder / und Paraffinschnitten durchgeführt. Neben der Beurteilung der Anfärbbarkeit war die Bestimmung der optimalen Verdünnung innerhalb einer Titrationsreihe von Bedeutung (Tabelle 1).

Für spezifische Fragestellungen wurden zusätzlich Doppelfärbungen durchgeführt (Tabelle 2). Die dargestellten Doppelfärbungen führen zu einer subtraktiven Farbverteilung. Dies bedeutet, dass Strukturen, die im ersten Schritt braun gefärbt sind, im zweiten Schritt nicht blau oder grün gefärbt werden können.

Tabelle 2: Doppelfärbung auf Cryo- und Paraffinschnitten

1. Primär-AK + Verdünnung	Nachweissystem	2. Primär-AK + Verdünnung	Nachweissystem
5F10 (1:500)	ABC/DAB	His57 (1:500)	ABC/HDBP
anti-Pan-Laminin (1:3000-5000)	ABC/DAB	His57 (1:200-1000)	BV/Fast Blue
asm-1 (1:1000)	ABC/DAB	His57 (1:500)	BV/Fast Blue
ED3 (1:500)	ABC/DAB	Ox34 (1:500)	ABC/HDBP
MIB-5	ABC/DAB	IgM (1:5000)	ABC/HistoGreen

Die Färbungen wurden auf Cryoschnitten durchgeführt. Nur bei MIB-5 und IgM wurden Paraffinschnitte verwendet.

2.5 Allgemeiner Versuchsablauf für Peroxidase-Systeme

Sowohl bei Cryo- als auch bei Paraffinschnitten unterscheiden sich die allgemeinen Versuchsabläufe in Abhängigkeit von Nachweissystem und Chromogen nur geringfügig voneinander. Zunächst findet eine Vorbehandlung der Schnitte statt, die sich aufgrund der Eigenschaften von cryo- bzw. paraffinfixierten Schnitten ergibt. Danach folgt in aller Regel eine Vorblockierung der endogenen Peroxidase-Aktivität. Nach anschließender Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgen Nachweis und Farbentwicklung. Zuletzt müssen die fertig gefärbten Schnitte eingedeckt werden.

2.5.1 Pufferlösungen

Vorab sollen an dieser Stelle die beiden im Rahmen immunhistologischer Techniken am häufigsten verwendeten Puffer vorgestellt werden:

PBS (phosphate buffered saline):

Mit der Eigenschaft als Pufferlösung bietet PBS ein Medium mit konstantem pH-Wert (pH 7,2) an. In seiner Zusammensetzung ergibt sich eine isotonische Salzlösung, welche nicht schädlich auf Zellen wirkt.

PBS wird als 10-fach konzentrierte Stammlösung angesetzt, wobei 80 g NaCl (Roth, Nr. 3957), 2 g KCl (Roth, Nr. 6781), 14,24 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Nr. 6580) und 2 g KH_2PO_4 (Merck, Nr. 4873) in 1000 ml Aqua bidestillata (A. bidest.) gelöst werden. (Anmerkung: Die Stammlösung kann bei Raumtemperatur für mindestens einen Monat gelagert werden!)

Für das gebrauchsfertige PBS werden 100 ml Stammlösung mit 900 ml A. bidest. versetzt. Der initiale pH-Wert dieser Lösung (~7,40 – 7,45) wird mit 1 N HCl (Merck, Nr. 9057) auf pH 7,2 gesenkt. (Anmerkung: Verdünntes PBS sollte innerhalb einer Woche verbraucht und bei 4°C gelagert werden!)

TBS (Tris(hydroxymethyl)aminomethane buffered saline):

6,05 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Merck, Nr. 8382) und 9 g NaCl werden in 700 ml A. bidest gelöst und mit 1 N HCl auf pH 7,6 eingestellt. Anschließend wird das Gemisch mit A. bidest. auf ein Gesamtvolumen von 1 Liter aufgefüllt.

2.5.2 Vorbehandlung der Schnitte

Cryoschnitte:

Die bei – 20°C gelagerten Schnitte werden für 10 min in Isopropanol (100%) bei 4°C fixiert. Während des Transfers sollten die Schnitte nur für eine minimale Kontaktzeit der Luft ausgesetzt sein. Besondere Vorsicht ist in Hinblick auf erwärmte Ausatemluft geboten!

Paraffinschnitte:

Paraffinschnitte müssen für die weitere Verarbeitung entparaffiniert werden. Dies erfolgt in Xylol (3 x 10 min) und einer absteigenden Isopropanolreihe (je 3 min: 2 x 100% → 96% → 90% → 80% → 70% → 50% → A. dest.) bei Raumtemperatur (RT).

Danach erfolgt eine Antigendemaskierung. Darunter versteht man die Renaturierung von Antigen determinanten bzw. AK-Bindungsstellen, wodurch verlorene Immunreaktivität aufgrund der Fixierung mit Formaldehyd unter der Temperaturerhöhung auf max. 60°C beim Einbetten teilweise wiederhergestellt werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit kam folgendes Verfahren zum Einsatz:

Autoklavieren mit Citratpuffer pH 6,0:

1,05 g Citronensäure-Monohydrat (Merck, Nr. 244) werden in 450ml A. bidest. gelöst. Mithilfe von 4 M NaOH wird ein pH von 6,0 eingestellt. Das Gemisch wird mit A. bidest. auf ein Gesamtvolumen von 500 ml aufgefüllt.

Die Schnitte werden in den angesetzten Citratpuffer gestellt und 20 min bei 121°C autoklaviert. Anschließend werden die Schnitte in PBS (pH 7,2) gespült.

2.5.3 Vorblockierung der endogenen Peroxidase-Aktivität

Sofern ein Nachweissystem verwendet wird, welches Peroxidase zur Polymerisation des Chromogens nutzt, ist es unerlässlich, die im Gewebe bereits vorhandene Peroxidase vorab zu blockieren. Ohne diesen Schritt kommt es zu einer Färbung von Zellen, die endogene Peroxidase oder Hämoglobin enthalten. Insbesondere Erythrozyten und Leukozyten besitzen eine starke endogene Peroxidaseaktivität.

Verschiedene Methoden stehen zur Auswahl; für diese Arbeit wurde mit Glucoseoxidase gearbeitet, um endogene Peroxidase durch einen Überschuss an frisch gebildetem H₂O₂ zu zerstören.

Als kleinster, aber zumeist ausreichender Ansatz werden 6 mg Glucoseoxidase (Sigma, Nr. G-6641) mit 1 ml PBS-Glucose-Puffer angesetzt. Dieser Ansatz ist berechnet für 17.300 units / g solid (Cave: die Units schwanken von Charge zu Charge.)

Für den PBS-Glucose-Puffer werden 180 mg beta-D-Glucose (MP Biomedicals,

Nr. 100953) und 6,5 mg Natriumazid (Baker, Nr. 97167) in 50 ml PBS (pH 7,2) gelöst. Der Puffer kann bei 4°C gelagert werden.

Pro Schnitt werden 50 µl verwendet. Alle Schnitte werden in einer feuchten Kammer für 1h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss werden die Schnitte mit PBS pH 7,2 gespült.

Dieses Vorgehen gilt für Cryo- und Paraffinschnitte gleichermaßen.

2.5.4 Primärantikörper

Um aussagekräftige fertige Präparate zu erhalten, muss eine optimale Verdünnung des jeweiligen Antikörpers angestrebt werden. Dies gelingt in einer meist geometrischen Verdünnungsreihe. Das beste optische Ergebnis gibt dann die optimale Verdünnung vor.

Verdünnt werden die Primärantikörper in einer Lösung aus PBS/BSA/Azid.

Dazu werden 200 mg BSA (Bovines Serumalbumin; Serva, Nr. 11930) mit 20 mg Natriumazid (Baker, Nr. 97167) in 20 ml PBS pH 7,2 gelöst.

Wird die ABC-Methode im nächsten Schritt als Nachweissystem angestrebt, wird Avidin-Stammlösung (1:300 = 0,003 mg/ml; Calbiochem Nr. 189725) der Verdünnungslösung aus PBS/BSA/Azid hinzugefügt.

Die verdünnten Primärantikörper werden auf die Schnitte gegeben und für 20h bei 4°C inkubiert.

Hiernach werden die Schnitte mit PBS (pH 7,2) gespült.

2.5.5 Sekundärantikörper und Nachweis

ABC-Methode:

Bei der ABC-Methode werden nach Inkubation der mit Avidin verdünnten Primärantikörper im Folgenden biotinylierte Sekundärantikörper verwendet. Es handelt sich hierbei um biotinyliertes anti-mouse IgG 1:200 (bzw. anti-rabbit IgG bzw. anti-mouse IgM - in Abhängigkeit vom verwendeten Primärantikörper). Das Avidin dient dazu, endogenes Biotin im Schnitt zu binden.

Der Sekundärantikörper wird in 5% NRS (Normalrattenserum; eigene Herstellung), Biotinstammlösung (1:50 = 0,02 mg/ml; Sigma Nr. B-4501) und PBS (pH 7,2) gelöst. Dabei werden für 1 µl Sekundärantikörper 10 µl NRS, 4 µl Biotinstammlösung und 185 µl PBS verwendet. Biotin wird zum Absättigen des eventuell im ersten Schritt gebundenen Avidins hinzugefügt.

Die Schnitte werden für 30 min bei RT mit dem Sekundärantikörper inkubiert und danach mit PBS gespült.

Nun wird die VECTASTAIN®-AB-Lösung (1:50) (Vector, Nr. PK-6102) hergestellt und ebenfalls für 30 min bei RT mit den Schnitten inkubiert. Es werden pro Schnitt 1 µl Lösung A, 1 µl Lösung B und 48 µl PBS verwendet. Hierbei handelt es sich um eine Avidin- und eine biotinylierte Peroxidase-Lösung.

Indirekter Nachweis mit Donkey-anti-sheep-Immunglobulin (Biodesign, Nr. W90360P):

Bei diesem Nachweissystem wird die klassische indirekte Nachweismethode genutzt: der Sekundärantikörper donkey-anti-sheep-Ig ist an Peroxidase konjugiert (1:100). Zur Verdünnung werden 5% NRS und PBS verwendet.

Dieses System wird für 60 min bei RT mit den Schnitten inkubiert. Es wird für Primär-AK von Schafen verwendet.

Bright Vision (Immunologic Meda, Nr. c-DPVB55AP):

Das Nachweissystem Bright Vision nutzt anstelle von Peroxidase alkalische Phosphatase (AP). Das System besteht aus zwei Schritten: Im ersten Schritt wird der Enhancer („Gold“ = Post-Antikörper Blocking = Brücken-AK für Maus-Primär-AK) mit 5% NRS versetzt und für 15 min bei RT mit den Schnitten inkubiert. Nach Spülen mit PBS wird im zweiten Schritt das Polymer („Ruby“ =

anti-Maus und anti-Kaninchen IgG, gekoppelt an ein Polymer, das zahlreiche AP-Moleküle trägt), ebenfalls versetzt mit 5% NRS, für 30 min bei RT inkubiert.

2.5.6 Farbentwicklung

Eine Vielzahl von Chromogenen ermöglicht eine unterschiedliche Farbentwicklung für den Antigennachweis. Erst dadurch sind Doppelfärbungen überhaupt möglich. Im Rahmen dieser Arbeit wurden vier verschiedene Chromogene genutzt: DAB, Histo Green, Fast Blue und Enzo Blue.

DAB arbeitet mit Peroxidase-basierten Nachweissystemen wie ABC und dem indirekten System donkey-anti-sheep-Ig und ergibt eine Braunfärbung. Histo Green ist ebenfalls für Peroxidase-Systeme vorgesehen und bewirkt eine Grünfärbung. Fast Blue arbeitet mit AP-Systemen und färbt blau/violett. High Def Blue for Peroxidase weist Peroxidase mit leuchtend blauer Farbe nach. Das Chromogen ist gekennzeichnet durch eine sehr gute Verstärkungswirkung, allerdings ist es in Doppelfärbung mit DAB auf Schnitten nur für wenige Wochen haltbar.

DAB (3,3'-Diaminobenzidin):

Vor der Farbentwicklung mit DAB werden die Schnitte mit TBS pH 7,6 gespült.

1 ml DAB-Lösung (Anmerkung: Nach dem Auftauen werden die Aliquots zentrifugiert und nur der flüssige Anteil, nicht das nach Zentrifugation entstandene Pellet am Boden des Eppendorf-Cups, verwendet.) werden mit 10µl H₂O₂ (Anmerkung: Verdünntes H₂O₂: 20µl 30%iges H₂O₂ + 500µl A. bidest.) versetzt und sofort tropfenweise für 10 min bei RT auf die Schnitte gegeben, bis diese komplett benetzt sind. Alsdann werden die Schnitte sofort mit A. bidest. abgespült. Das Spülen erfolgt über einer Küvette mit Chlorbleichlauge zur Neutralisation des DAB.

Zuletzt erfolgt erneutes Spülen der Schnitte in PBS (pH 7,2).

Histo Green (Linaris, Nr. E109M):

Anmerkung: Histo Green wurde nur zum Nachweis von IgM auf Paraffinschnitten verwendet.

Ein Tropfen Histo Green-Chromogen wird mit 0,5 ml Histo Green-Puffer sowie einem Tropfen H₂O₂ versetzt und gut gemischt. Die Schnitte werden nach

Inkubation mit dem Sekundärantikörper donkey-anti-sheep-Ig mit PBS gespült und nun unter Sichtkontrolle für 5 min bei RT mit Histo Green inkubiert. Anschließend werden die Schnitte mit PBS gespült. Da Histo Green in wässrigem Medium nicht stabil ist, sollten die Schnitte *s o f o r t* weiterverarbeitet werden.

Für Doppelfärbungen empfiehlt es sich aus dem gleichen Grund, Histo Green als letztes Chromogen einzusetzen.

Fast Blue (Sigma, Nr. F3378-1G):

Nach Inkubation der Schnitte mit Bright Vision werden diese mit Tris-HCl pH 8,2 gespült.

Zur Farbentwicklung werden 1 mg Fast Blue mit 1 ml Naphthol AS-MX-Phosphatpuffer und 4 µl Levamisol-Stocklösung angesetzt und das Filtrat zur Inkubation verwendet. Dabei erfolgt die Inkubation für 10 min bei RT im Dunkeln (!). Auch der noch nicht verwendete Teil des Filtrats wird derweil im Dunkeln verwahrt. Nach den 10 min wird die Lösung nochmals filtriert, die Schnitte werden mit Tris-HCl gespült und für weitere 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss werden die Schnitte mit PBS gespült.

High Def Blue for Peroxidase (Enzo Lifescience AG, ADI-950-150-0030):

Vor Anwendung dieses Chromogens werden die Schnitte mit PBS gespült. Das gebrauchsfertige Enzo Blue muss zuvor aus Substrat und Puffer im Verhältnis 1:50 angesetzt werden. Die Schnitte werden anschließend in PBS gespült.

2.5.7 Eindecken

Das Eindecken der Präparate erfolgt in Abhängigkeit vom Chromogen. DAB und Histo Green sind in Alkohol und organischen Lösungsmitteln beständig und werden in einem Acrylat (Eukitt, Fluka, Nr. 03989) - eingedeckt. Fast Blue und High Def Blue for Peroxidase müssen hydrophil in Polyvinylalkohol (Mowiol, 9,6g Mowiol Sigma-Aldrich Nr. 32459-0 + 24g Glycerin Merck 1.04095.0250) + 24ml A.dest.) - eingedeckt werden.

DAB:

Vor dem Eindecken werden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70% → 90% → 2 x 100% für jeweils 1 min) und in Xylolbädern (2 x 3min) entwässert.

Anschließend werden die Schnitte in Eukitt eingedeckt.

Histo Green:

Die Schnitte werden kurz in A. dest. gespült, danach 3 x für je 20s in Alkohol (100%), zuletzt 2 x für je 30s in Xylol entwässert. Das Eindecken erfolgt in Eukitt.

Fast Blue & High Def Blue for Peroxidase:

Es ist nicht notwendig, die Schnitte vor dem Eindecken zu entwässern.

Zum Eindecken wird Mowiol verwendet. Da Mowiol eher eintrocknen kann, sollten die Deckgläschen nach dem Trocknen mit Eukitt umrandet werden.

3. ERGEBNISSE

In der vorliegenden Arbeit soll die Zellzusammensetzung der Rattenmilz mithilfe verschiedener Antikörper näher charakterisiert werden.

Insgesamt wurden 17 Antikörper in Einfachfärbung getestet. Um diese in einer logischen Reihenfolge abzuhandeln, werden sie unter Berücksichtigung ihres stärksten Färbeverhaltens in Gruppen behandelt.

So werden die Verteilung der Stromazellen, Erythrozyten, Endothelzellen, Granulozyten, Makrophagen, T- und B-Zellen in ebendieser Reihenfolge beschrieben.

Doppelfärbungen werden immer nach der Einzelfärbung mit dem zweiten Primärantikörper beschrieben.

3.1 Stromazellen und extrazelluläre Matrix (Tabelle 3)

3.1.1 – 1A29 (CD54 / ICAM-1; Abb.3)

ICAM-1 ist ein typisches Adhäsionsmolekül auf Endothelzellen und Fibroblasten, das u.a. an das aktivierte Integrin CD11a/CD18 (LFA-1) auf wandernden Lymphozyten bindet. Es ist speziell für die Wanderung von Zellen in der Marginalzone der Milz von Bedeutung (Tedford et al., 2017). ICAM-1 wird bei Ratten stark von Endothelzellen der hochendothelialen Venulen in Lymphknoten und Peyer-Platten exprimiert (Tamatani and Miyasaka, 1990).

Unter dem besonderen Augenmerk auf Stromazellen sollen zunächst die FRCs in der T-Zell-Zone betrachtet werden. Dabei zeigen sich der Form nach typische länglich verzweigte, braun gefärbte Strukturen in einer ansonsten ungefärbten T-Zell-Zone. Durch 1A29 werden somit die FRCs der T-Zell-Zone sichtbar. ICAM-1-positive Stromazellen liegen auch in der Adventitia der Zentralarterie. T-Zellen selbst werden aber nicht angefärbt.

In Bezug auf FDCs gibt ein Blick auf Follikelregionen wenig Auskunft; die Follikel sind aufgrund zahlreich gefärbter B-Zellen nahezu einheitlich braun gefärbt, weshalb eine Aussage über die Anfärbung von FDCs nicht möglich ist.

Neben den folliculären B-Zellen werden auch MZ-B-Zellen dargestellt, was ein – ähnlich zu den Follikeln – nahezu einheitlich braunes Färbemuster im Bereich der MZ ergibt.

Auffällig ist eine besonders starke Anfärbung im Bereich des MS. Möglicherweise werden durch 1A29 somit die in diesem Bereich befindlichen MMM angefärbt. Die Abgrenzung ist aufgrund der hohen Menge gefärbter B-Zellen in Follikeln und MZ allerdings auch hier nicht klar möglich.

Die RP mit den Milzsträngen stellt sich im Sinne einer deutlich ausgeprägten Braunfärbung dar; eine genaue Abgrenzung der Zellen voneinander fällt schwer. Vermutlich werden mehrere Subpopulationen von Zellen angefärbt. Ins Auge fallen kleine dunkel gefärbte mononukleäre Zellen, bei denen es sich der Form nach um NK-Zellen handeln könnte.

In Hinblick auf Endothelzellen zeigen sich Arterien- und Venenendothel gefärbt; Sinusendothel wird nicht oder nur minimal angefärbt.

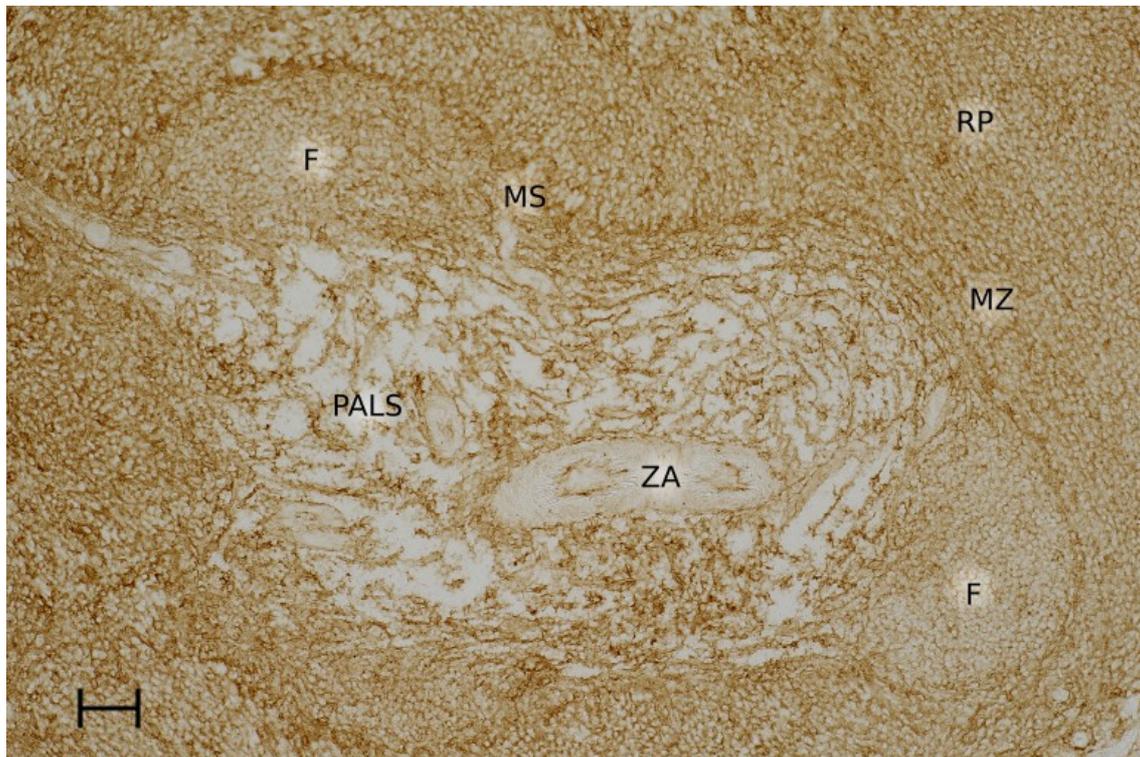


Abbildung 3: Nachweis von 1A29 (Cryo, Einfachfärbung mit DAB). (F) Follikel, (MS) Marginalsinus, (MZ) Marginalzone, (PALS) Periarterielle Lymphatische Scheide, (ZA) Zentralarterie, (RP) Rote Pulpa. Der Maßstabsbalken entspricht 50µm.

3.1.2 – 5F10 (CD106 / VCAM-1; Abb. 4)

VCAM-1 stellt wie ICAM-1 ein Adhäsionsmolekül für Lymphozyten dar. Es ist auf Fibroblasten und Endothelzellen exprimiert und bindet das aktivierte Integrin VLA-4 (CD49b/CD29) (Sanz et al., 1998).

Das Färbeverhalten von 5F10 weist Parallelen zu 1A29 auf: auch mithilfe von 5F10 zeigen sich länglich verzweigte, braun gefärbte Strukturen in der T-Zell-Zone – FRCs – in einer ansonsten ungefärbten Umgebung. Damit werden die T-Zellen auch durch diesen Antikörper nicht dargestellt.

In Hinblick auf FDCs finden sich – je nach Anschnitt – teils zentral im Follikel, teils zur T-Zell-Zone ausgerichtete Ansammlungen angefarbter Zellen. Die Art der Anordnung der Zellen - teilweise dreieckig, aber nicht rundlich - deutet dabei nicht auf das Anfärben von Keimzentrums-B-Zellen sondern auf FDCs, vor allem in der hellen Zone des Keimzentrums. Dieser Frage nachgehend wurde eine Doppelfärbung durchgeführt, welche den Verdacht auf FDCs erhärtete (s. Doppelfärbung 5F10 + His57, S. 47f.).

Bei der Mehrzahl der Follikel lässt sich nur eine schwach gefärbte Mantelzone und eine stärker angefarbte zentrale Struktur erkennen, die einem Keimzentrum ähnelte. Ein Follikel zeigt jedoch 3 verschiedene Bereiche.

Im Gegensatz zu 1A29 werden durch 5F10 allerdings weder in den Follikeln noch in der MZ B-Zellen angefarbt. Hierdurch lässt sich erkennen, dass die Stromazellen der MZ nicht oder extrem schwach mit 5F10 reagieren.

Die Region des MS zeigt schwach angefarbte Zellen in Richtung T-Zell-Zone, möglicherweise eine Mischung aus MMM und Fibroblasten.

Die RP mit den Milzsträngen ist deutlich angefarbt; dadurch ist die Abgrenzung verschiedener Zellen bzw. Zellarten voneinander nicht möglich.

In Hinblick auf Endothelzellen färben sich Arterien- und deutlich schwächer Venenendothel. Das Sinusendothel ist aufgrund der hohen Dichte angefarbter Zellen in der RP nicht klar abzugrenzen; es erscheint teilweise ungefärbt.

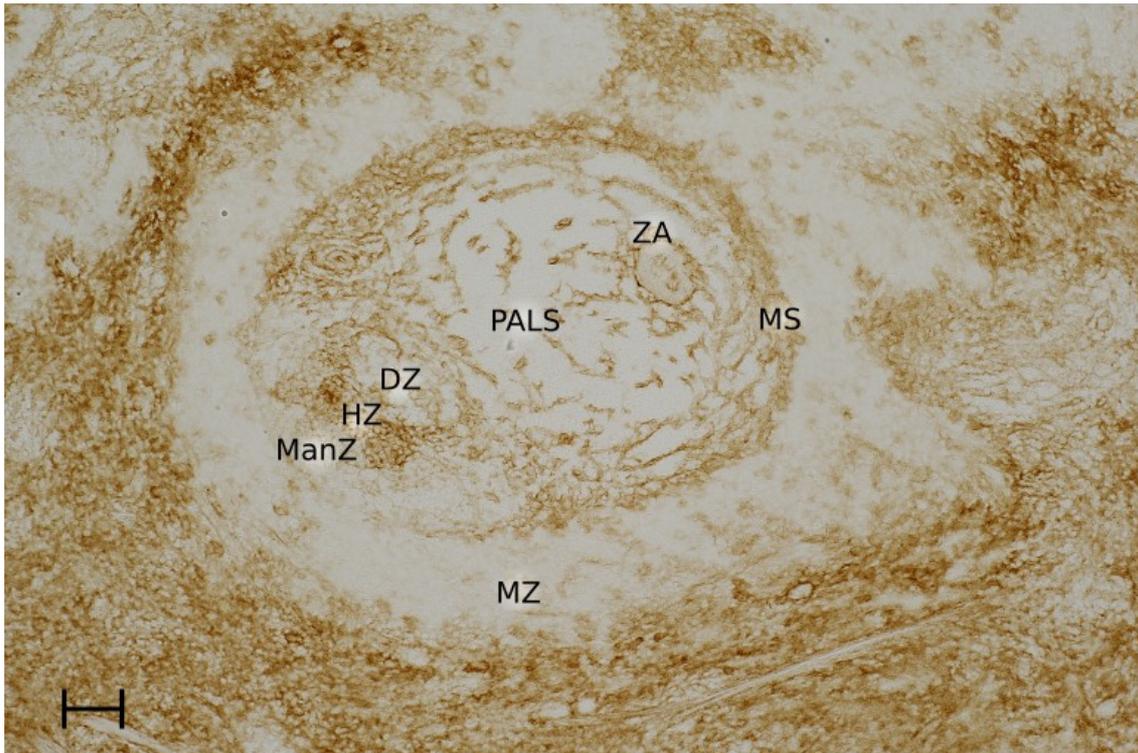


Abbildung 4: Nachweis von 5F10 (Cryo, Einfachfärbung mit DAB). (MS) Marginalsinus, (MZ) Marginalzone, (PALS) Periarterielle Lymphatische Scheide, (ZA) Zentralarterie, (DZ) Dunkle Zone, (HZ) Helle Zone, (ManZ) Mantelzone. Die Zuordnung der Follikelzonen orientiert sich an Abb. 15 (S. 48). Der Maßstabsbalken entspricht 50µm.

3.1.3 – anti-Pan-Laminin (Pan-Laminin; Abb. 5)

Vor den Ausführungen zum Färbeverhalten sei kurz noch einmal erwähnt, dass es sich bei Laminin um extrazelluläre Matrix, also ein Produkt von Zellen – und nicht wie bei ICAM-1 und VCAM-1 um eine Darstellung von Zellmembran und Zellinnerem – handelt. Nur ortsständige Zellen und Endothel können Laminin herstellen. Laminin stellt einen trimolekularen Proteinkomplex dar, der in Basallaminae vorkommt. Es wurde in der Rattenmilz von van den Berg et al. (1989) untersucht. In der Rattenmilz ist Laminin mit vielen Fibroblasten und den von ihnen produzierten Fasern assoziiert.

In der WP zeigt sich ein mehr oder weniger grobes „Netzwerk“ in PALS und Follikeln. An der Oberfläche von beiden Bereichen fällt eine faserartige und teilweise flächige Anordnung von stärkerer Laminin-Immunreaktivität auf. Laminin ist offensichtlich an verzweigte retikuläre Fasern angelagert, auf denen Fibroblasten sitzen. Bei diesen handelt es sich in den Follikeln vermutlich um FDCs oder eine Subpopulation von FDCs und in der PALS um FRCs.

Die restliche T-Zell-Zone bleibt ungefärbt, was darauf hinweist, dass Lymphozyten kein Laminin herstellen.

Auch in den Follikeln zeigen sich derartige Fasern, welche jedoch ein deutlich feineres Muster aufweisen und dünner erscheinen als die Fasern in der T-Zell-Zone. Die restliche Umgebung in den Follikeln bleibt ungefärbt.

Ein noch feineres Lamininnetzwerk zeigt sich im Bereich der MZ; dadurch grenzt sich die MZ deutlich von benachbarten Zonen ab. In einer Doppelfärbung (s. Doppelfärbung anti-Laminin + His57, S. 49) wird die besonders feine Lamininstruktur in der MZ noch einmal verdeutlicht. Anti-Laminin und der mAb Ox43 (s. S. 40f.) weisen somit die einzigen im Rahmen dieser Arbeit detektierbaren extrazellulären Strukturen der MZ nach.

Der Bereich des MS färbt sich deutlich an. Dabei lässt sich eine dunklere Färbung an der Oberfläche der Follikel im Vergleich zur Oberfläche der PALS darstellen.

In der RP zeigt sich die feinste Lamininverteilung, welche diffus und teilweise dünner als in WP und MZ erscheint.

Die Milztrabekel enthalten massiv Laminin und stellen sich entsprechend sehr deutlich dar. Anti-Laminin färbt ebenfalls deutlich die Basalmembran unter den Endothelzellen von Blutgefäßen aufgrund der enthaltenen Basalmembranen, sowie glatte Muskulatur durch Anfärbung der Basallaminae.

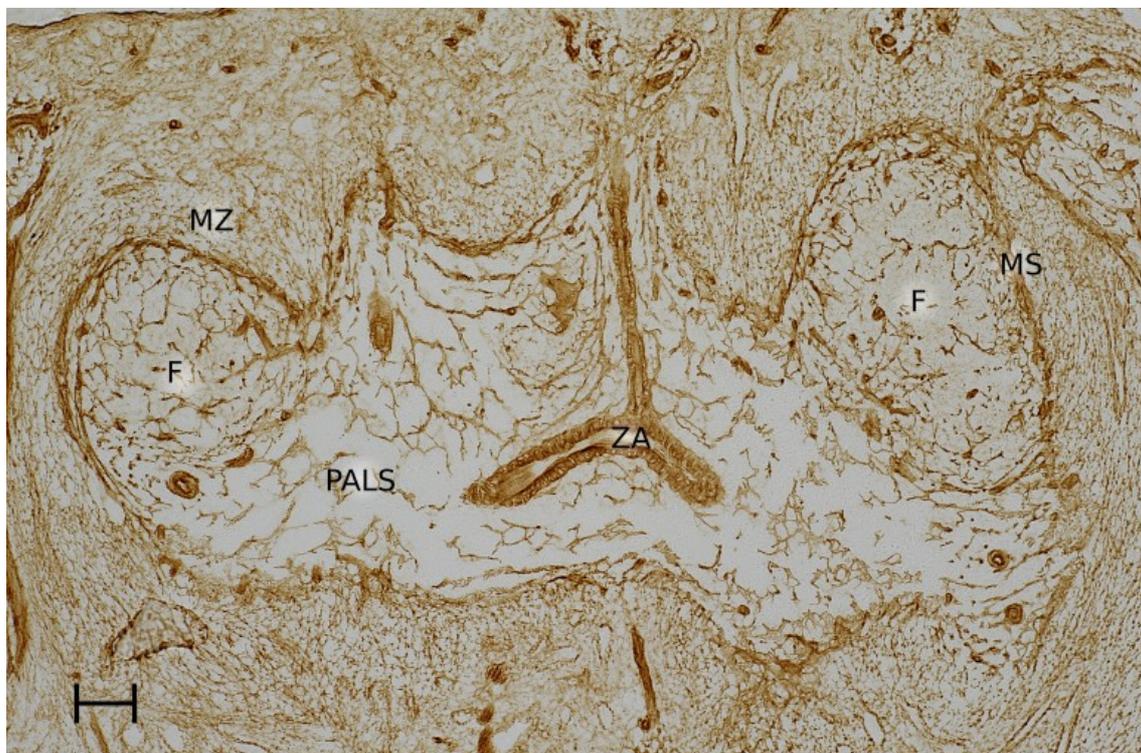


Abbildung 5: Nachweis von anti-Pan-Laminin (Cryo, Einfachfärbung mit DAB). (F) Follikel, (MZ) Marginalzone, (PALS) Periarterielle Lymphatische Scheide, (ZA) Zentralarterie, (MS) Marginalsinus. Der Maßstabsbalken entspricht 50µm.

3.1.4 asm-1 (Glattmuskel-alpha-Aktin; Abb. 6)

Glattmuskel alpha-Aktin (SMA, smooth muscle alpha-actin) ist in der glatten Muskulatur von Gefäßwänden und anderen Hohlorganen exprimiert. Zusätzlich kommt SMA in aktivierten Fibroblasten und Myoepithelzellen vor.

Bei Glattmuskel-alpha-Aktin handelt es sich um einen intrazellulären Zellbestandteil. Der mAb asm-1 bindet an Mikrofilamente im Zellinneren. Bei Cryoschnitten kann die Fixierung mit Isopropanol nicht vollständig verhindern, dass intrazelluläre (nicht membran-gebundene) Moleküle geringfügig beim Waschen ausgespült werden. Dies führt bei der glatten Muskulatur von größeren Gefäßen zur Ablagerung ausgewaschenen hellbraun-gefärbten Antigens in der Umgebung.

Mithilfe des Antikörpers asm-1 stellen sich die FRCs als länglich verzweigte, braun gefärbte Strukturen in der T-Zell-Zone positiv dar. Ihre Dichte nimmt zur Oberfläche der PALS zu. Aufgrund der farblich ausgesparten Umgebung innerhalb der PALS lässt sich schließen, dass T-Lymphozyten kein immunhistologisch nachweisbares Glattmuskel-alpha-Aktin enthalten.

B-Zell-Regionen wie Follikel und MZ bleiben komplett ungefärbt. Dies bedeutet, dass FDCs sich durch fehlende Expression von SMA grundlegend von FRCs unterscheiden. Zur besseren Darstellung von Lymphozytenbereichen wurde eine Doppelfärbung durchgeführt (s. Doppelfärbung asm-1 + His57, S. 50).

Die Oberfläche der Follikel wird allerdings angefärbt. Dabei könnte es sich um die Bereiche des MS handeln und damit um gefärbte MMM. Morphologisch ähnelt die Anordnung der gefärbten Zellen aber Fibroblasten, sodass es sich in Analogie zu Mensch und Maus um MRCs, eine Fibroblasten-Subpopulation an der Oberfläche von Follikeln, handeln könnte (Katakai, 2012; Golub et al., 2018). Diese Zellen scheinen sich kontinuierlich von der Oberfläche der PALS auf die Follikel fortzusetzen.

Die Milzkapsel und Milztrabekel in der RP – und damit deren Fibroblasten – können mithilfe von asm-1 nachgewiesen werden. Trabekel sind in der RP sehr dicht angeordnet. In der RP werden zusätzlich Gruppen von Fibroblasten angefärbt.

Die glatte Muskulatur von Gefäßen stellt sich dar, nicht aber das Endothel.

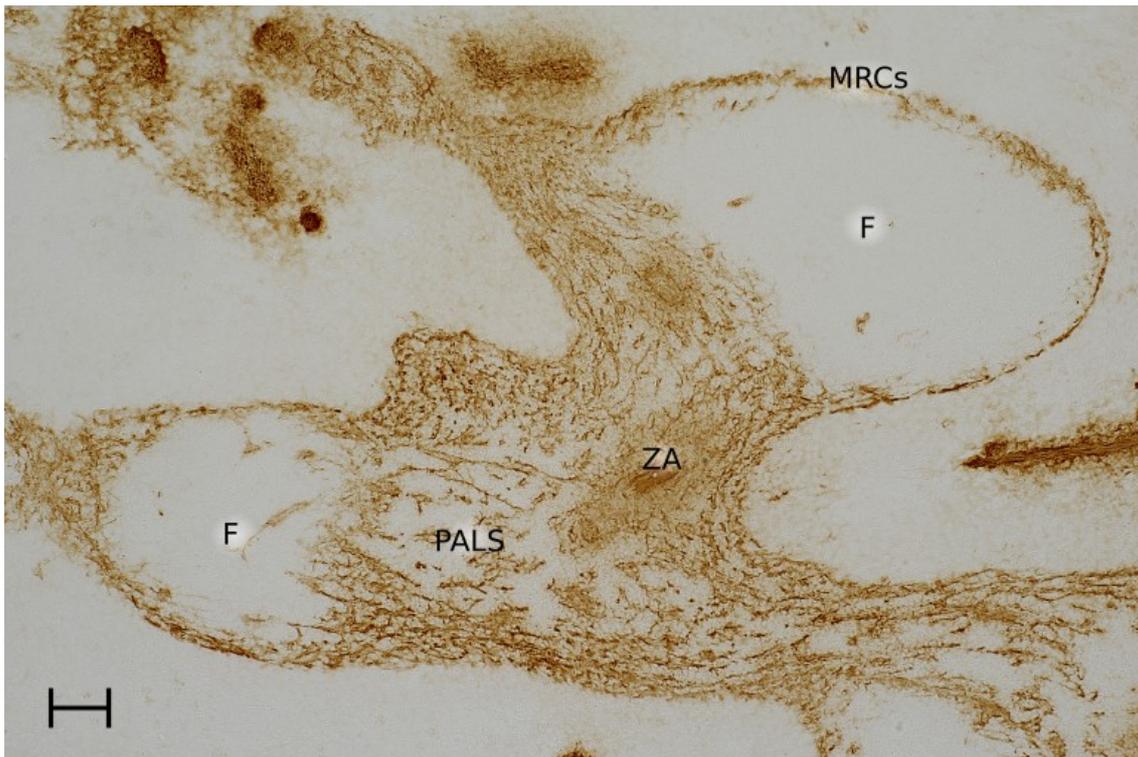


Abbildung 6: Nachweis von asm-1 (Cryo, Einfachfärbung mit DAB). (F) Follikel, (PALS) Periarterielle Lymphatische Scheide, (ZA) Zentralarterie, (MRCs) Marginal reticular cells.
 Anmerkung: „Verwaschen“ wirkende Bereiche sind auf die Tatsache zurückzuführen, dass nicht-membranständige Antigene sich aus alkoholfixierten Cryoschnitten leicht ausspülen lassen.
 Der Maßstabsbalken entspricht 50µm.

3.1.5 Ox43 (Antigen unbekannt; Abb. 7)

Die starke Expression von Ox43 ist sehr unerwartet und lässt sich in der RP keiner speziellen Zellart zuordnen. Aus diesem Grund wurden zusätzliche Organe wie Pankreas, Leber und Niere untersucht. Zum Vergleich mit den Resultaten von Robinson et al. (1986) wurde auch das Gehirn in die Untersuchung mit einbezogen.

Insgesamt färbt Ox43 eine größere Fläche in der Milz als alle anderen ratten-spezifischen AK.

Von den ortsständigen Zellen färben sich weder FRCs noch FDCs an. Bei den schwach angefärbten Strukturen in der PALS handelt es sich vermutlich um IDCs.

PALS und Follikel bleiben insgesamt nahezu ungefärbt und wirken wie „Löcher“ innerhalb der positiven Fläche von Ox43.

Die MZ gehört zum stark gefärbten Bereich der Milz. In diesem Kompartiment ist in höherer Vergrößerung ein grobes Netzwerk erkennbar, das Ähnlichkeit zur Anordnung von Laminin aufweist. Speziell an der Grenze zur PALS werden

retikuläre Fasern sichtbar.

Besonders markant ist das schlagartige Abbrechen der Färbung am MS.

In der Übersichtsvergrößerung stellt sich die RP deutlich positiv und nahezu einheitlich dunkelbraun gefärbt dar, sodass eine Differenzierung der Zellen voneinander kaum möglich ist. Ox43 lässt sich auf Paraffinschnitten nicht einsetzen, sodass keine bessere Auflösung des Färbemusters erreicht werden kann.

Arterienendothel und Kapillaren in der WP stellen sich positiv dar. Sinusendothel und Venenendothel in der RP sind aus technischen Gründen nicht klar abgrenzbar. Da die Sinus aber nicht ausgespart sind, sind auch diese wahrscheinlich als positiv zu verzeichnen.

Die Färbung für Ox43 ergibt ein sehr ungewöhnliches Färbemuster in der Roten Milzpulpa und speziell in der MZ. Da das erkannte Antigen bisher nicht charakterisiert ist, wurde seine Verteilung in verschiedenen Organen getestet.

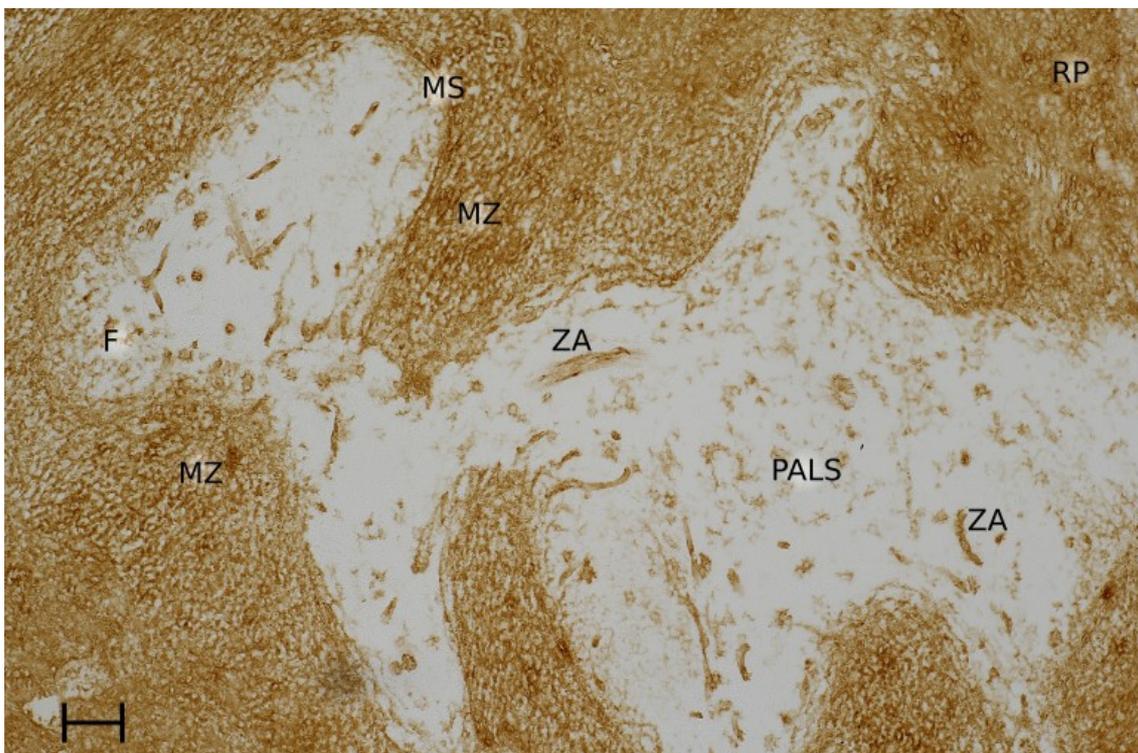


Abbildung 7: Nachweis von Ox43 (Cryo, Einfachfärbung mit DAB). (RP) Rote Pulpa, (MZ) Marginalzone, (PALS) Periarterielle Lymphatische Scheide, (MS) Marginalsinus, (F) Follikel, (ZA) Zentralarterie. Der Maßstabsbalken entspricht 50µm.

3.1.5.1 Ox43 – Verteilung in anderen Organen

Pankreas (Abb. 8):

Im Pankreas färben sich vorwiegend die Endothelien in einem Kapillarnetzwerk an, das die exokrinen Azini umgibt. Besonders auffallend sind die sinusoiden Kapillaren in Langerhans-Inseln und die Kapillaren in der Adventitia von Ausführungsgängen. Zusätzlich färbt sich das Endothel in großen Gefäßen an. Es ist nicht auszuschließen, dass auch Schaltstücke des ausführenden Gangsystems dargestellt werden. Die Epithelien größerer intralobulärer Ausführungsgänge sind jedoch ungefärbt. Zusätzlich erscheinen Nerven und möglicherweise Lymphgefäße positiv. Fettzellen erweisen sich ebenfalls als positiv, Kollagenfasern bleiben ungefärbt.

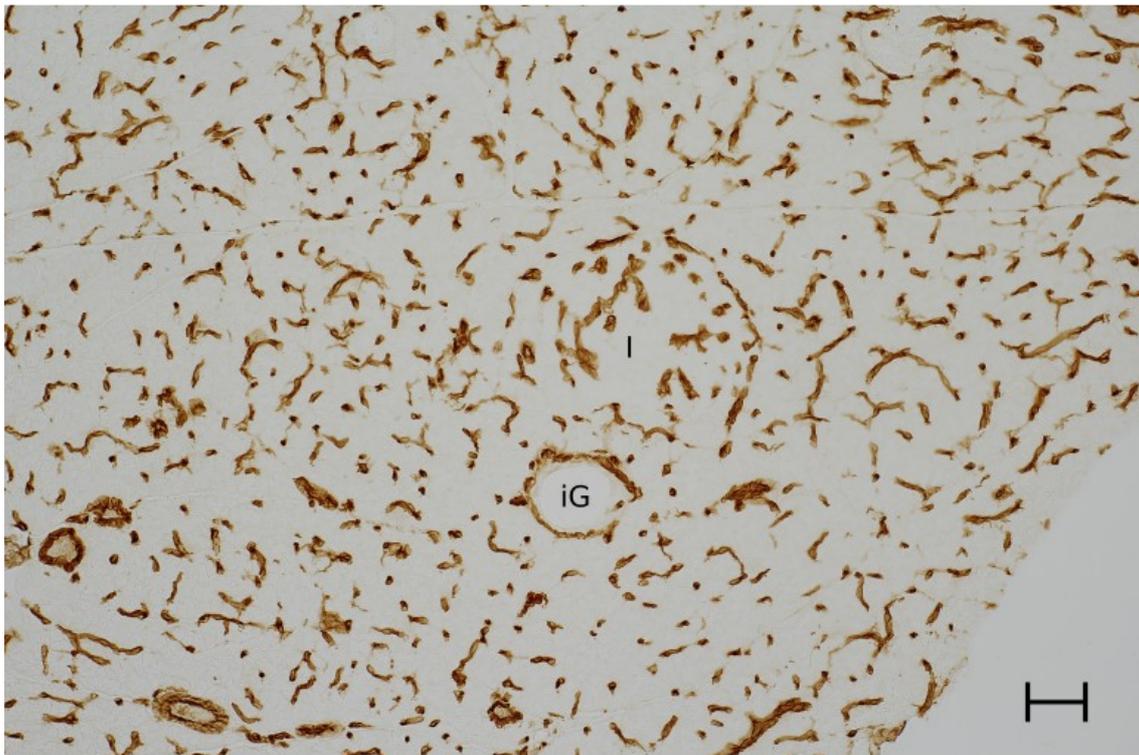


Abbildung 8: Nachweis von Ox 43 im Pankreas (Cryo, Einfachfärbung mit DAB). (I) Insel, (iG) intralobulärer Ausführungsgang. Fettzellen sind in diesem Anschnitt nicht dargestellt. Der Maßstabsbalken entspricht 50µm.

Herz (Abb. 9):

Im Herzen werden insbesondere Kardiomyozyten und Glanzstreifen positiv dargestellt. Desweiteren werden Endokard, Kapillaren und Endothel in größeren Arterien und Venen angefärbt.



Abbildung 9: Nachweis von Ox43 im Herzen (Cryo, Einfachfärbung mit DAB). (G) Glanzstreifen, (Endo) Endokard. Der Maßstabsbalken entspricht 50µm.

Niere (Abb. 10):

In der Niere werden die Fibroblasten der Nierenkapsel, das Kapillarendothel in den Glomerula, peritubuläre Kapillaren und vermutlich die Henle-Schleifen positiv angefärbt. Weiterhin stellen sich das Endothel in großen Arterien und Venen, sowie Adventitiafibroblasten von Arterien positiv dar. Es stellen sich die parietalen Zellen der Bowmanschen Kapsel dar; es könnte sich hierbei aber ebenfalls um intertubuläre Fibroblasten handeln. Tubuluszellen erscheinen nicht angefärbt.

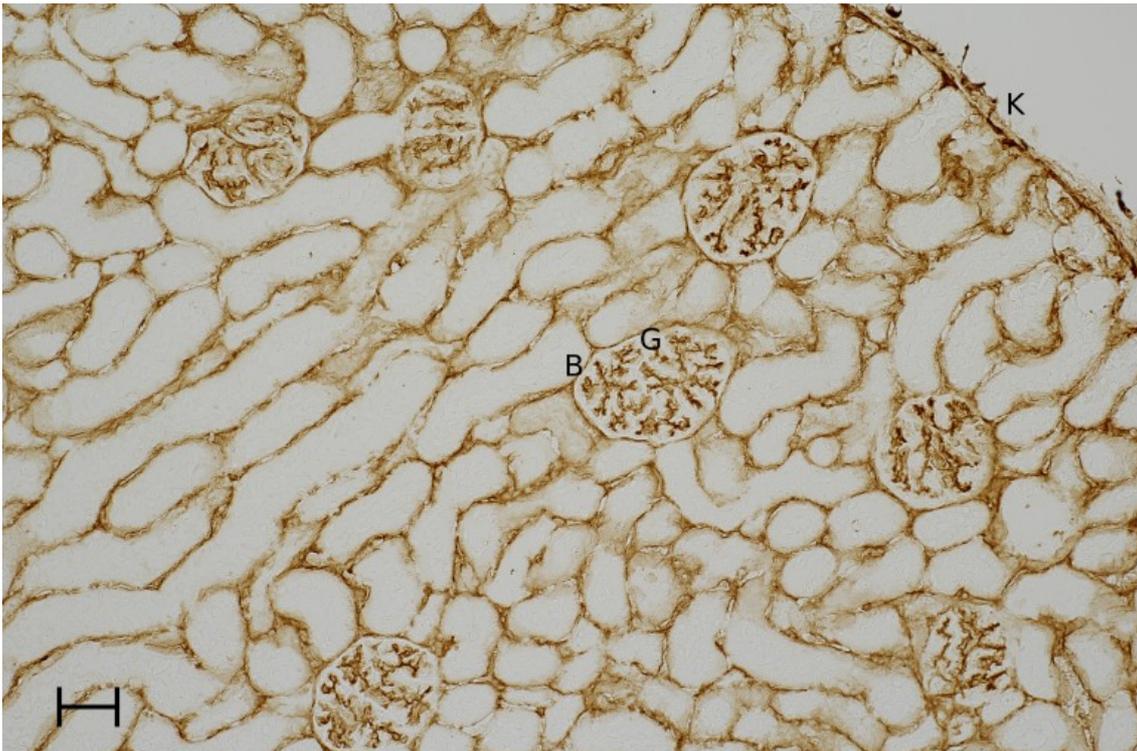


Abbildung 10: Nachweis von Ox43 in der Nierenrinde (Cryo, Einfachfärbung mit DAB). (K) Kapsel, (G) Glomerulum. Der Maßstabsbalken entspricht 50µm, (B) Bowmansche Kapsel.

Leber (Abb.11):

Die Kapsel, Hepatozyten um Zentralvenen und Sublobularvenen, Kupferzellen, fraglich auch Ito-Zellen (i.e. Hepatische Sternzellen), periportales und perivenöses Bindegewebe, sowie Arterien und Venen großer Gefäße werden mithilfe von Ox43 in der Leber angefärbt. Im Gegensatz dazu lassen sich Sinusendothel und der Disse-Raum nicht darstellen. Auch die Hepatozyten in der Peripherie der Zentralvenenläppchen - und somit die Mehrzahl aller Hepatozyten - ist ungefärbt.

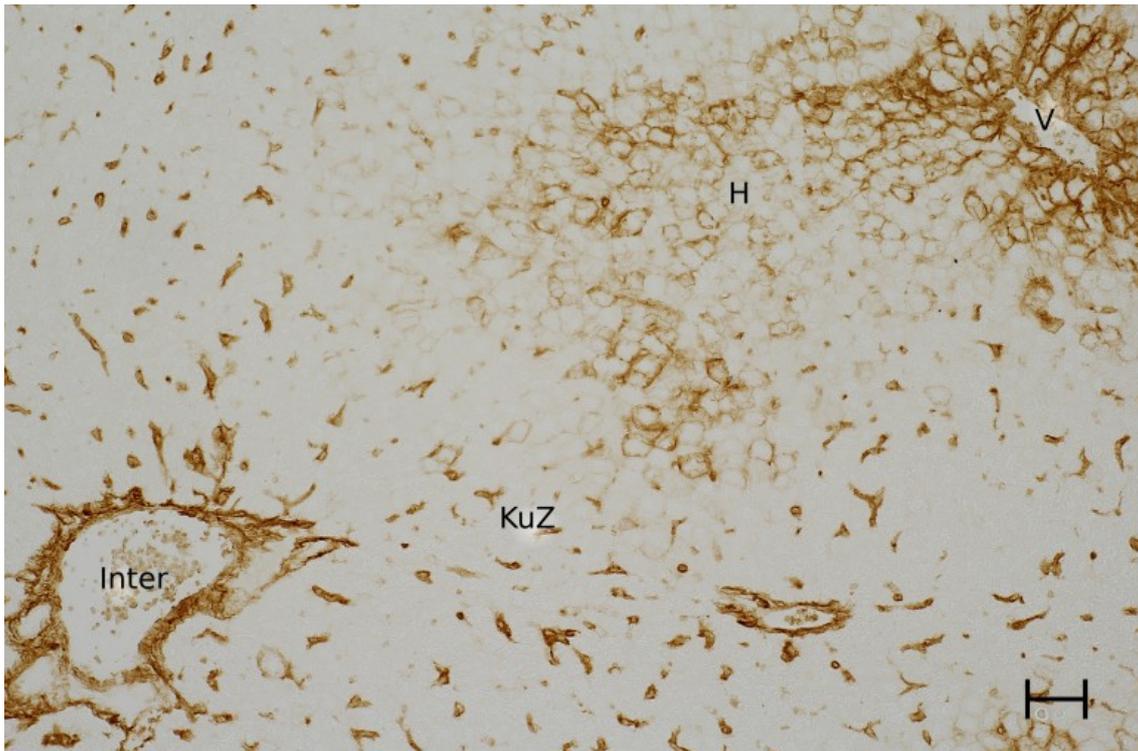


Abbildung 11: Nachweis von Ox43 in der Leber (Cryo, Einfachfärbung mit DAB). (Inter) Portalfeld mit Interlobularvenen, (V) Zentralvene, (H) Hepatozyten, (KuZ) Kupffer-Zellen oder Ito-Zellen; die beiden Zellarten sind in dieser Färbung nicht voneinander differenzierbar. Der Maßstabsbalken entspricht 50µm.

Gehirn (Abb. 12):

In der grauen Substanz des Großhirns zeigt sich eine schwache Positivität von Endothelzellen in Kapillaren.

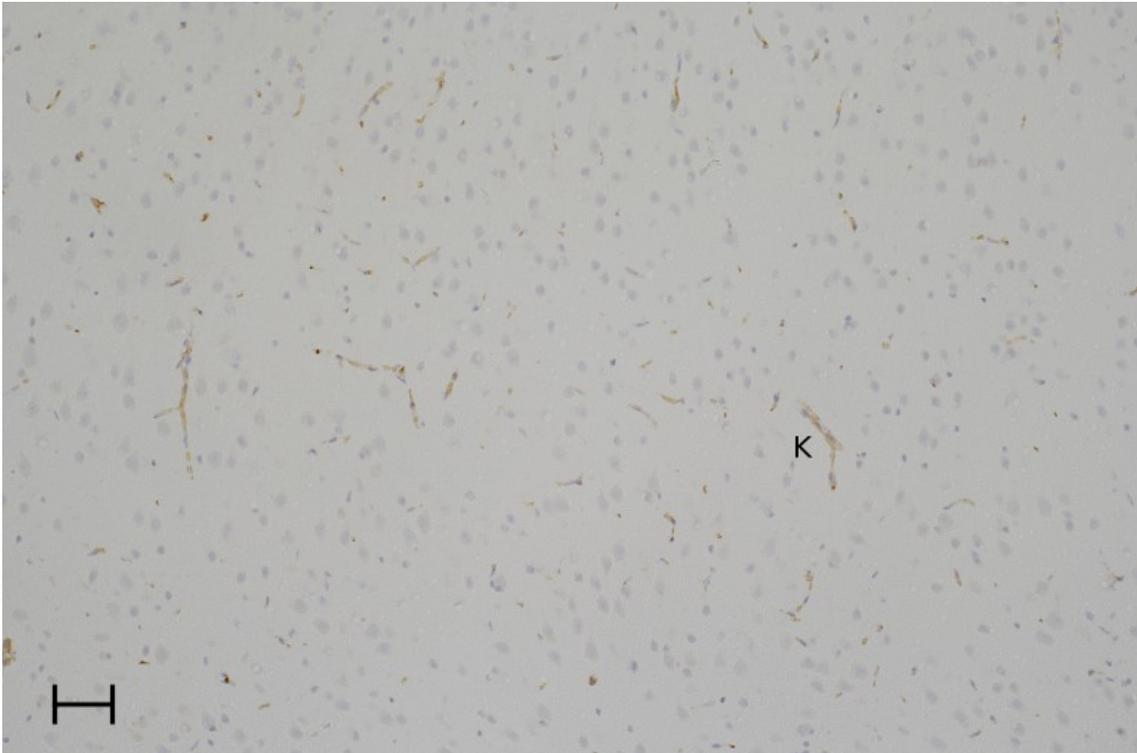


Abbildung 12: Nachweis von Ox43 im Großhirn (Cryo, Einfachfärbung mit DAB). (K) Kapillare. Der Maßstabsbalken entspricht 50μm.

Tabelle 3: Phänotyp von Stromazellen der Weißen Pulpa

AK	FRCs	FDCs	MRCs	Sonstiges
1A29	++	?	?	B-Zellen (F + MZ), Endothelzellen
5F10	++	+	?	Endothelzellen
asm-1	++	-	++	Gefäße (glatte Muskulatur)
Ox43	-	-	?	IDCs, Endothelzellen

(FRCs) Fibroblastische Retikulumzellen. (FDCs) Follikuläre dendritische Zellen. (MRCs) Marginale Retikulumzellen. (IDCs) Interdigitierende dendritische Zellen.

Legende: (++) stark positiv, (+) positiv, (-) negativ, (?) Keine Aussage möglich.

3.2 B-Zellen (Tabelle 4)

3.2.1 His57 (Antigen unbekannt; Abb. 13)

Mit His57 werden vor allem die MZ-B-Zellen prominent dargestellt (Dammers et al., 2000; Hendricks et al., 2011). Das detektierte Antigen ist bisher unbekannt. Zusätzlich werden jedoch auch follikuläre B-Lymphozyten gefärbt.

Die Anzahl und Färbeintensität follikulärer His57⁺-B-Lymphozyten scheint jedoch zwischen einzelnen Follikeln zu schwanken. Teilweise scheinen die follikulären B-Zellen weniger stark gefärbt als MZ-B-Zellen. Der Bereich des MS wird nicht gefärbt. Auch in der RP werden kleine Zellhaufen in der Nähe der MZ sichtbar. Es lässt sich keine Aussage darüber machen, ob es sich dabei um in der RP vorkommende B-Zellen handelt oder um angeschnittene Anteile der MZ. Einzelne schwach angefärbte Zellen kommen überall in der RP vor. T-Zellen werden nicht dargestellt. Möglicherweise werden auch im Bereich der äußeren T-Zell-Zone B-Zellen angefärbt. Diese lassen sich jedoch schlecht gegenüber der deutlich positiven MZ abgrenzen. Es zeigt sich eine ganz schwache Färbung einzelner Zellen in der PALS.

His57 wurde in zahlreichen Doppelfärbungen aufgrund seiner deutlichen Darstellung von Follikeln und MZ eingesetzt.

Weiterhin lässt sich eine deutliche Ähnlichkeit zu dem AK His52 (s. S. 60f.) feststellen, welcher neben MZ- und follikulären B-Zellen insbesondere Endothel darstellt.

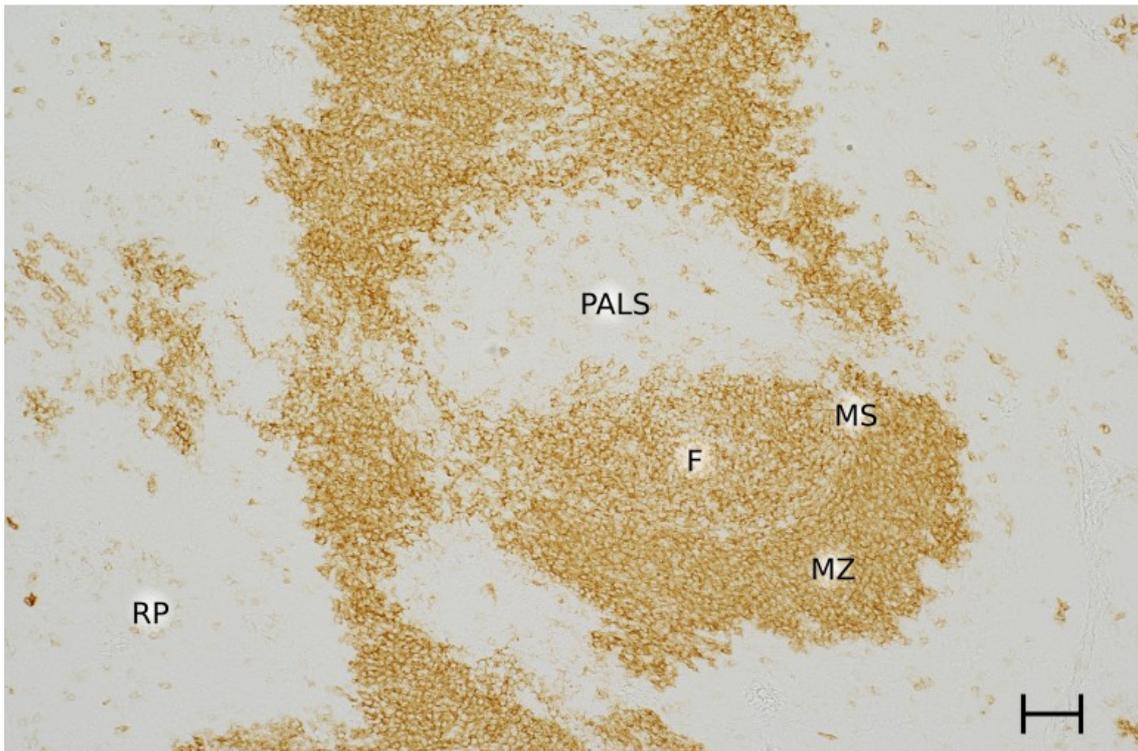


Abbildung 13: Nachweis von His57 (DAB) (Cryo, Einfachfärbung). (F) Follikel, (MZ) Marginalzone, (MS) Marginalsinus, (PALS) Periarterielle Lymphatische Scheide, (RP) Rote Pulpa.

Der Maßstabsbalken entspricht 50µm.

3.2.1.1 Doppelfärbung 5F10 und His57 (Abb. 14, 15)

Die Doppelfärbung von 5F10 (CD106/VCAM-1; braun) und His57 (Antigen unbekannt; blau) diente der Fragestellung, ob 5F10 FDCs in den Follikeln anfärbt. In Einfachfärbung mit 5F10 fand sich teilweise ein dunkler gefärbter Bereich in den Follikeln, der in Bezug auf die verschiedenen Follikelregionen analysiert werden sollte. Es zeigte sich, dass sämtliche Follikel ein 5F10-positives Zentrum hatten. Mangels ausreichender Auflösung in Cryoschnitten ließ sich die dendritische Form der Zellen an dieser Stelle jedoch nicht eindeutig erkennen. Werden Milzschnitte des gleichen Tiers mit IgD gefärbt, zeigen sich maximal 1 – 2 Keimzentren pro Schnitt. Dies legt nahe, dass es sich bei dem 5F10 positiven Bereich überwiegend um den zentralen Teil von Primärfollikeln handelt. Ein Follikel (s. Abb. 15) weist jedoch ein Zentrum auf, das aus einem fast ungefärbten Bereich in der Nähe der PALS und einem stark braunen Bereich in der Nähe der His57-schwach positiven Mantelzone besteht. Dies lässt sich nur so interpretieren, dass es sich bei dem ungefärbten Bereich um die dunkle Zone und bei dem stark braunen Bereich um die FDCs in der hellen Zone eines Keimzentrums handelt. Da sich auch in der dunklen Zone des

Keimzentrums und in der Mantelzone FDCs befinden müssen, ist diese Vorstellung unerwartet.

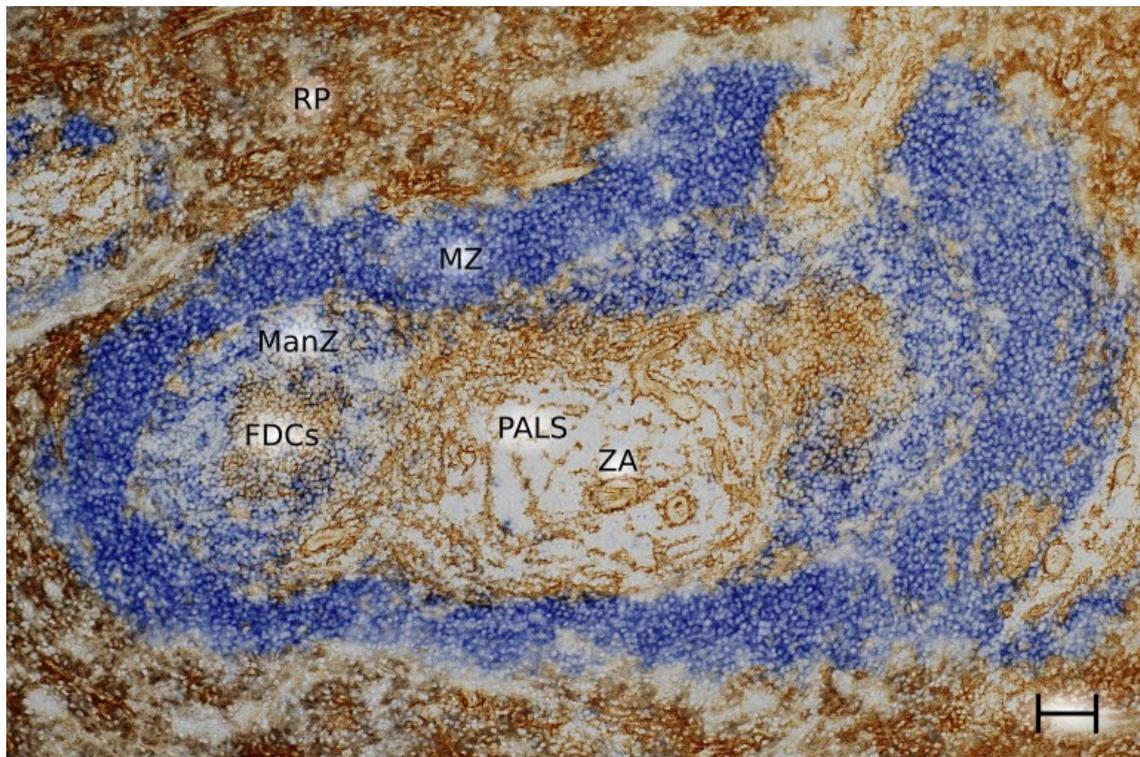


Abbildung 14: Nachweis von 5F10 (DAB) und His57 (Enzo Blue) (Cryo). (RP) Rote Pulpa, (MZ) Marginalzone, (ZA) Zentralarterie, (PALS) Periarterielle Lymphatische Scheide, (ManZ) Mantelzone, (FDCs) Follikuläre dendritische Zellen. Der Maßstabsbalken entspricht 50 µm.

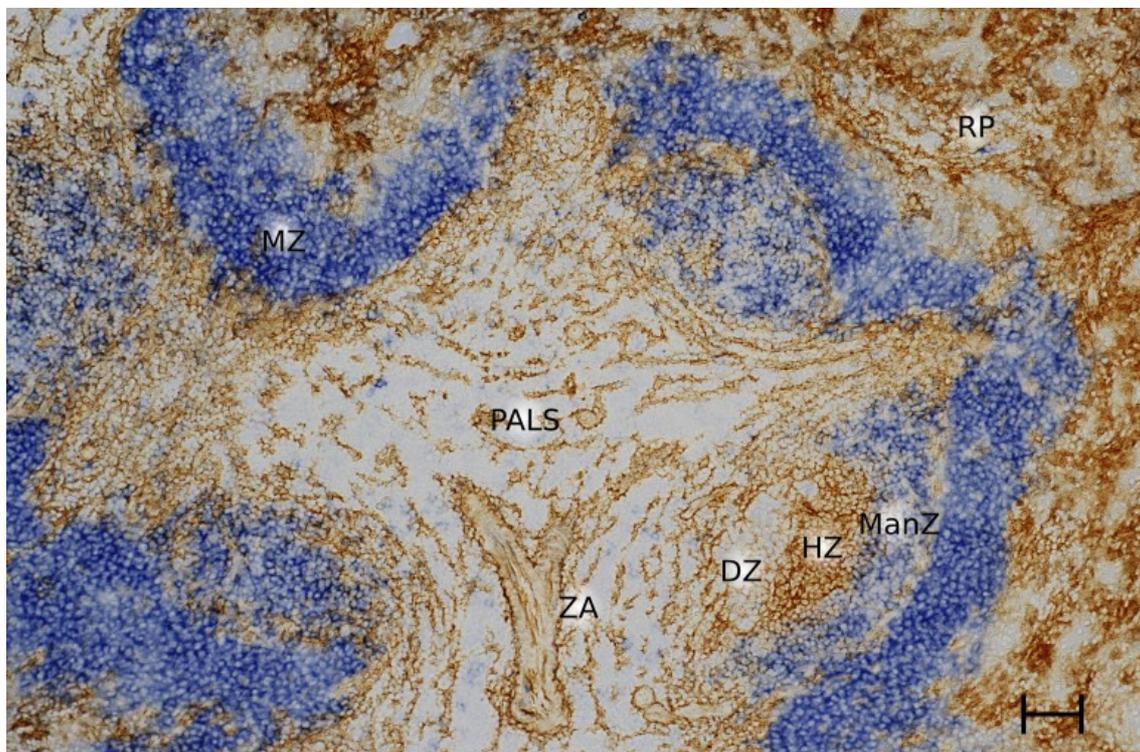


Abbildung 15: Nachweis von 5F10 (DAB) und His57 (Enzo Blue) (Cryo). (RP) Rote Pulpa, (MZ) Marginalzone, (ZA) Zentralarterie, (PALS) Periarterielle Lymphatische Scheide, (ManZ) Mantelzone, (HZ) Helle Zone mit FDCs, (DZ) Dunkle Zone. Der Maßstabsbalken entspricht 50µm.

3.2.1.2 Doppelfärbung Laminin und His57 (Abb. 16)

In der Einfachfärbung mit Laminin war das Netzwerk-artige Muster aufgefallen, welches sich in Follikel, PALS, MZ- und RP-Regionen deutlich unterschied, sodass sich jede Region durch eine spezielle Anordnung des Laminin-Maschenwerks auszeichnete. In der Doppelfärbung sollte die Verteilung der B-Zellen innerhalb dieses Netzwerk-Musters genauer untersucht werden. Insbesondere die MZ enthält ein außergewöhnlich feines Lamininmuster. In der Doppelfärbung scheinen teilweise einzelne His57-positive MZ-B-Zellen jeweils von einer solchen Masche aus Laminin umhüllt zu sein, sodass die Anwesenheit von His57-positiven B-Zellen in der MZ völlig mit dem MZ-typischen Lamininmuster korreliert ist.

Außergewöhnlich ist auch die deutliche, teilweise flächige Färbung für Laminin im Bereich des MS.

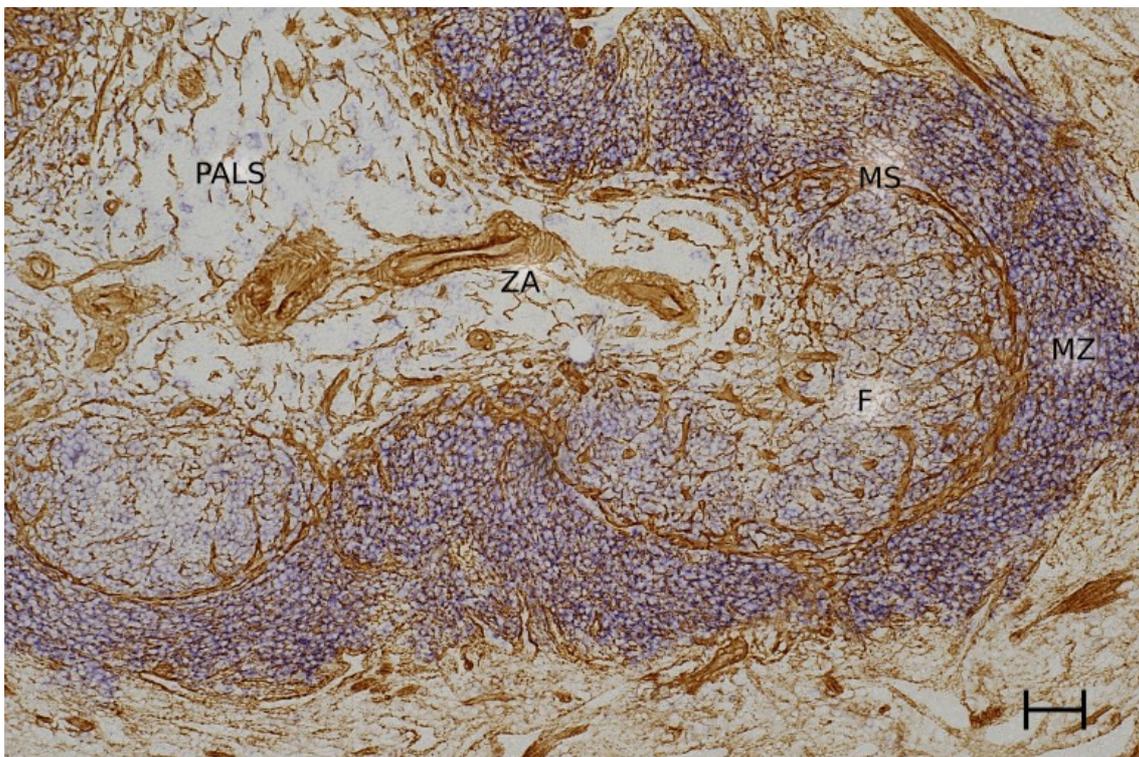


Abbildung 16: Nachweis von Laminin (DAB) und His57 (Fast Blue) (Cryo). (F) Follikel, (MZ) Marginalzone, (MS) Marginalsinus, (ZA) Zentralarterie, (PALS) Periarterielle Lymphatische Scheide.

Der Maßstabsbalken entspricht 50µm.

Es fällt auf, dass die Verteilung von Laminin (Abb. 16) und VCAM-1 (Abb. 15) in den Follikeln sehr unterschiedlich ist.

3.2.1.3 Doppelfärbung asm-1 und His57 (Abb. 17)

In der Einfachfärbung mit dem mAb asm-1 war eine Färbung im Bereich des MS aufgefallen. Zur deutlicheren Abgrenzung der Kompartimente voneinander wurde eine Doppelfärbung mit His57 durchgeführt. Die Doppelfärbung zeigt, dass sich der Bereich des MS deutlich braun darstellt, jedoch kurze ungefärbte Bereiche enthält. Beim Menschen färbt asm-1 bestimmte, vermutlich aktivierte Fibroblasten; auch bei Ratten kann dies angenommen werden. In Abb. 17 fällt auf, dass einer der beiden Primärfollikel genauso stark für His 57 gefärbt ist wie die MZ.

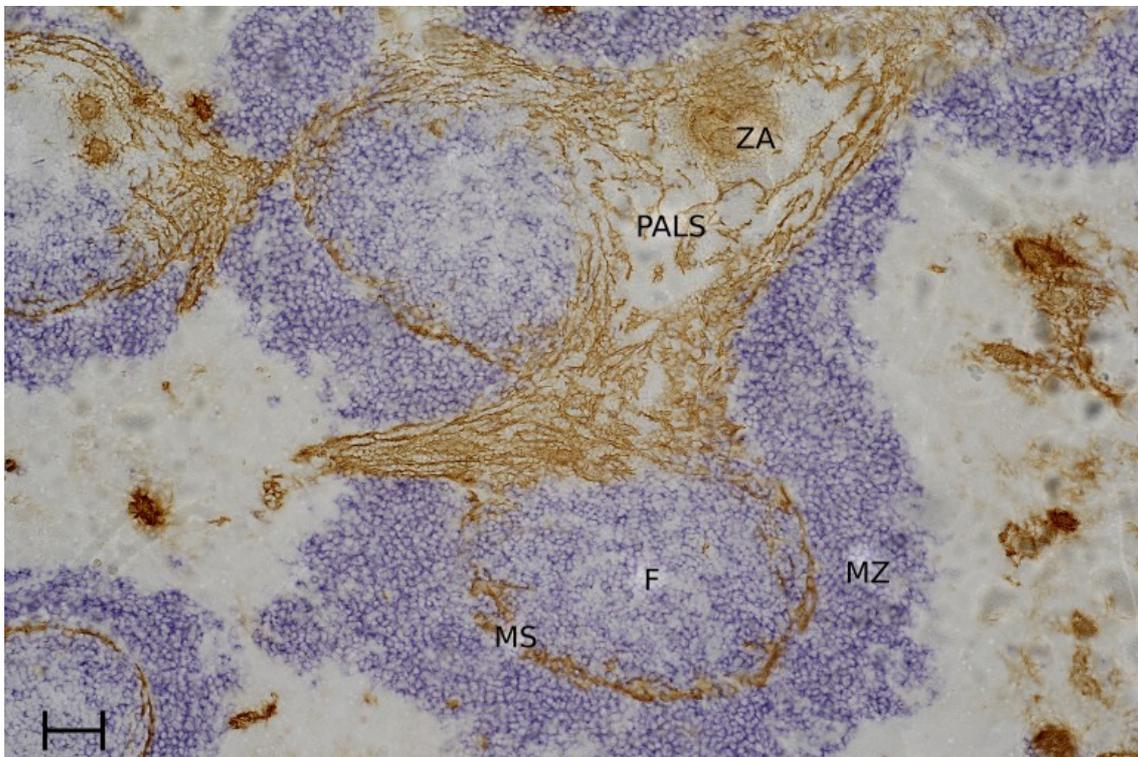


Abbildung 17: Nachweis von asm-1 (DAB) und His57 (Fast Blue) (Cryo). (F) Follikel, (MZ) Marginalzone, (MS) Marginalsinus, (ZA) Zentralarterie, (PALS) Periarterielle Lymphatische Scheide.

Der Maßstabsbalken entspricht 50µm.

3.2.2 MARD-3 (IgD; Abb. 18, 19)

Mithilfe des mAb MARD-3 lassen sich IgD⁺-B-Zellen darstellen (Bazin, 1990).

Stark gefärbte IgD⁺-B-Zellen repräsentieren kleine rezirkulierende B-Lymphozyten. Diese werden insbesondere in Primärfollikeln oder in der Mantelzone von Sekundärfollikeln angefärbt. Keimzentrums-B-Zellen lassen sich nicht anfärben, da sie IgD herunterregulieren.

In der MZ exprimiert die Mehrzahl der B-Zellen IgD nur schwach. Eine größere Menge stark IgD⁺-B-Zellen ist jedoch auch vorhanden. Es existieren somit zwei verschiedene B-Zell-Populationen.

T-Zellen werden nicht angefärbt; in der oberflächlichen T-Zell-Zone lassen sich aber einzelne positive B-Zellen nachweisen. Vereinzelt positive Zellen finden sich auch in der RP. Besonders auffällig sind Ansammlungen positiver Zellen um Arteriolen herum, was an die Anordnungen in den menschlichen Kapillarröhren erinnert. Möglicherweise stellt sich hier ein Einwanderungsweg für IgD⁺-B-Zellen in die Follikel entlang von Gefäßen dar.

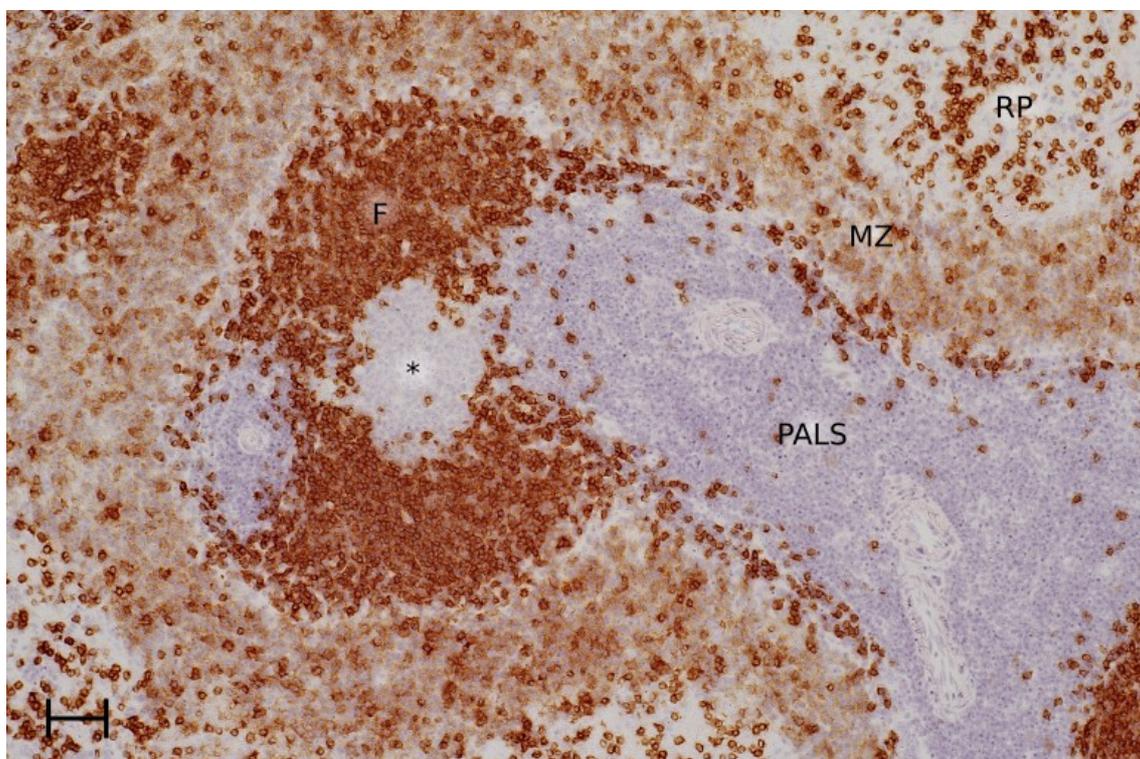


Abbildung 18: Nachweis von MARD-3 (DAB) (Cryo, Einfachfärbung, HE). (MZ) Marginalzone, (F) Follikel, (PALS) Periarterielle Lymphatische Scheide, (RP) Rote Pulpa, (*) Keimzentrum

Es zeigt sich ein Follikel mit KeimZ und ManZ. Der Maßstabsbalken entspricht 50µm.

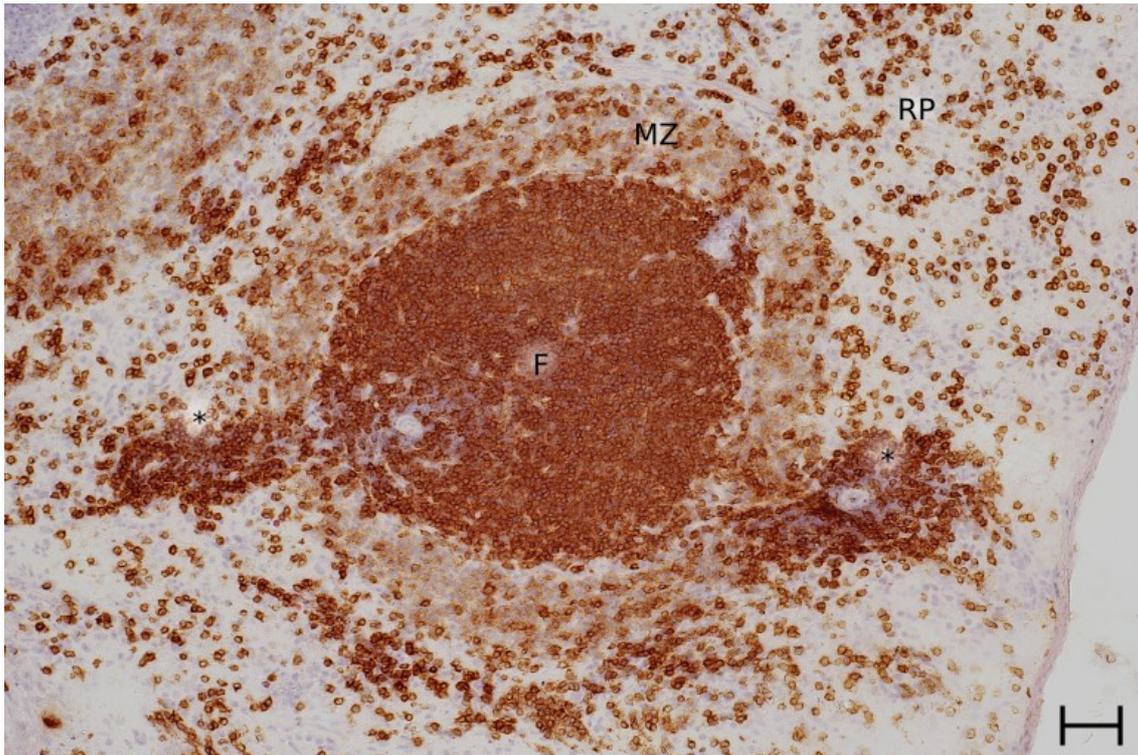


Abbildung 19: Nachweis von MARD-3 (DAB) (Cryo, Einfachfärbung, HE). (MZ) Marginalzone, (F) Follikel, (RP) Rote Pulpa, (*) Lymphozytenansammlungen um Arteriolen herum.

Der Follikel ist entweder ein Primärfollikel oder es handelt sich um die Mantelzone eines Sekundärfollikels. In diesem Schnitt ist keine PALS angeschnitten. Der Maßstabsbalken entspricht 50µm.

3.2.3 IgM (IgM; Abb. 20)

IgM wird zusammen mit IgD auf der Oberfläche kleiner rezirkulierender B-Zellen und auf MZ-B-Zellen exprimiert. In der vorliegenden Untersuchung musste der polyklonale anti-IgM-Primär-AK verhältnismäßig hoch verdünnt werden, um die Mitfärbung von interstitiellem IgM zu vermeiden. Dies führte zu einer leicht reduzierten Färbung der B-Zellen in Follikeln und der MZ, verbesserte jedoch den Nachweis von intrazellulärem IgM in Plasmablasten und Plasmazellen. Große Zellen mit intrazellulärem IgM finden sich einerseits in der äußeren T-Zell-Zone und andererseits in der RP. Zusätzlich finden sich diese Zellen in MZBC. Der MS wird nicht angefärbt.

In einer Doppelfärbung mit dem mAb MIB-5 (Ki-67) sollte die Lokalisation von Plasmazellen und Plasmablasten dargestellt werden.

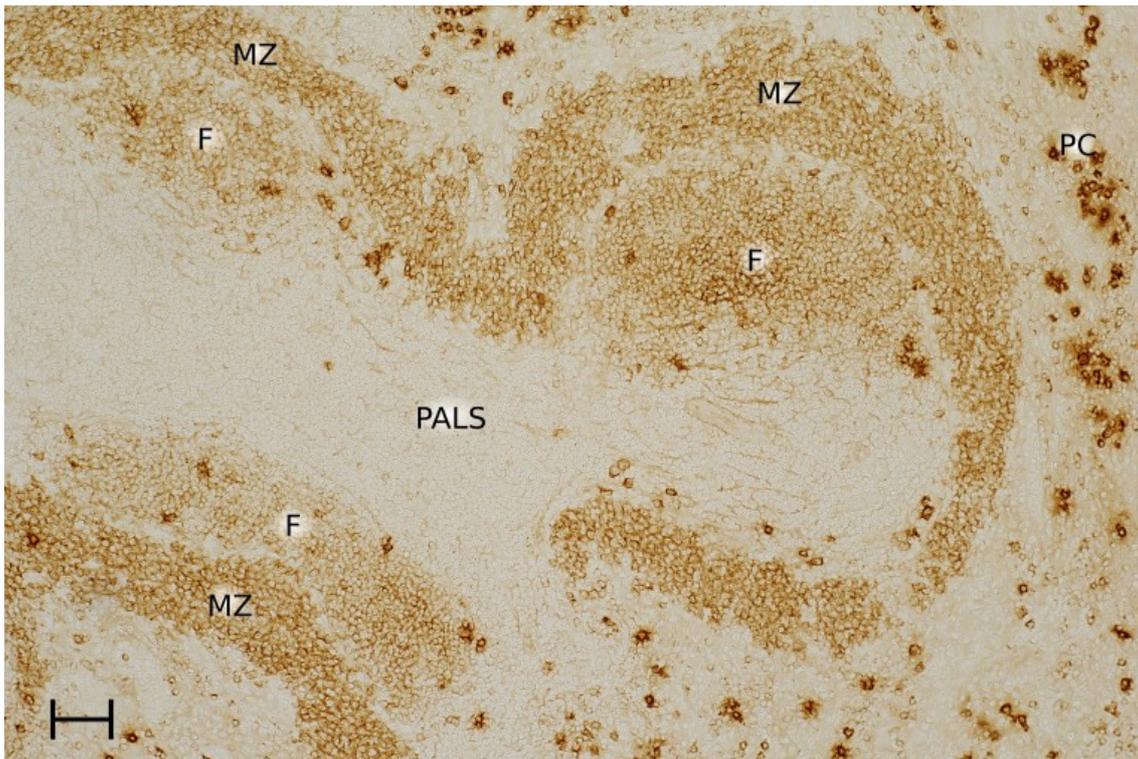


Abbildung 20: Nachweis von IgM (DAB) bei hoher Verdünnung zur Vermeidung der Mitfärbung von interstitiellem IgM (Cryo, Einfachfachfärbung, 1:4000). (MZ) Marginalzone, (PALS) Periarterielle lymphatische Scheide, (F) Follikel, (PC) Plasmazellen.

Anmerkung: „Verwaschen“ wirkende Bereiche sind auf die Tatsache zurückzuführen, dass nicht-membranständige Antigene sich aus alkoholfixierten Cryoschnitten leicht ausspülen lassen. Die Milzkapsel befindet sich knapp unterhalb des unteren Bildrandes. Die MZ endet asymmetrisch im Bereich der unteren PALS in der Nähe der Milzkapsel. Der Maßstabsbalken entspricht 50µm.

3.2.3.1 Doppelfärbung IgM und MIB-5 (Abb. 21, 22, 23)

Bei 6 Tieren wurde eine DF für den proliferations-assoziierten Transkriptionsfaktor Ki67 und IgM durchgeführt. Ki-67 wurde im ersten Schritt in brauner Farbe und IgM im zweiten Schritt in dunkelgrüner Farbe dargestellt. Der Primär-AK gegen IgM wurde dabei hochverdünnt eingesetzt, um ausschließlich intrazelluläres IgM darzustellen. Mit dieser Methode sollte versucht werden, proliferierende Plasmablasten (dunkelgrüne Zellen mit braunen Kernen) von nicht-proliferierenden Plasmazellen (dunkelgrüne Zellen mit ungefärbten Kernen) abzugrenzen. Dunkelgrüne Zellen ohne erkennbaren Kern wurden nicht beachtet. Keimzentren mit Haufen brauner Zellkerne traten in allen Präparaten vereinzelt auf (Abb. 23).

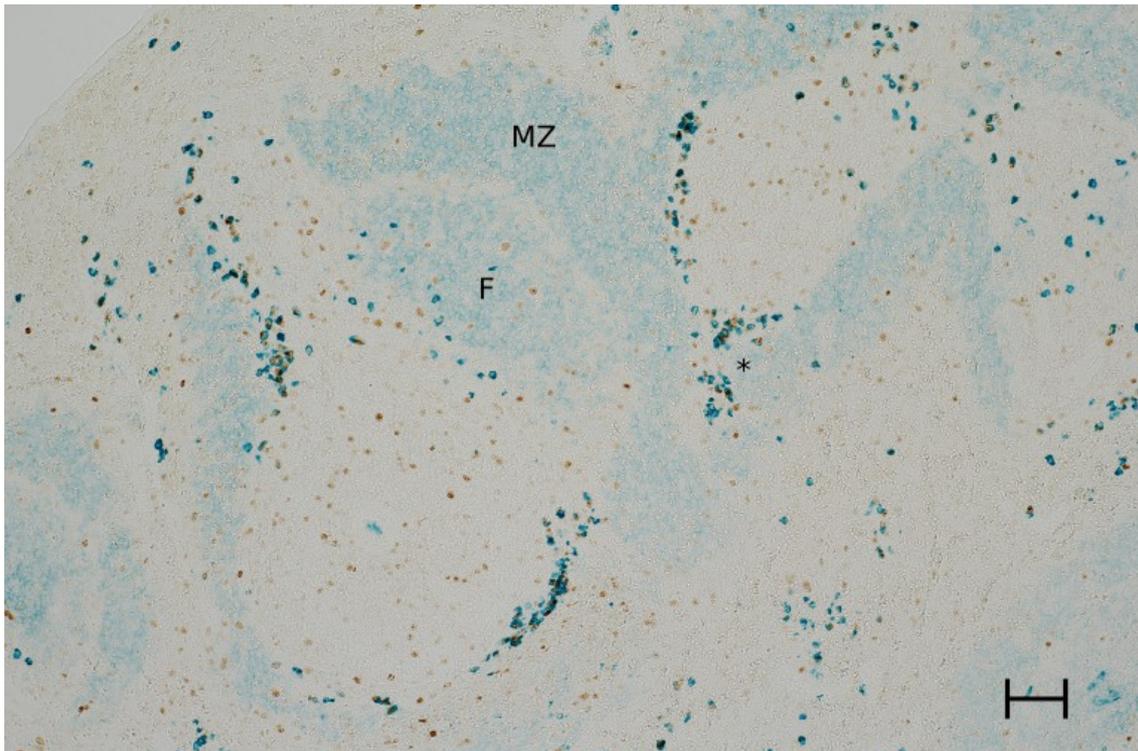


Abbildung 21: Nachweis von MIB-5 (DAB) und intrazellulärem IgM (HistoGreen). (MZ) Marginalzone, (F) Follikel, (PALS) Periarterielle Lymphatische Scheide, (*) Bildausschnitt für Abb. 22, vermutlich MZBC. Der Maßstabsbalken entspricht 50µm.

Die Menge an intrazellulär IgM-positiven Zellen variierte von Tier zu Tier erheblich. Das 17 Wochen alte konventionell gehaltene Tier wies jedoch nicht mehr IgM-positive Plasmazellen auf als die übrigen Tiere. Sowohl in der RP wie auch in der äußeren PALS exprimierte ungefähr die Hälfte aller intrazellulär IgM-positiven Zellen Ki-67 (Abb. 21, 22).

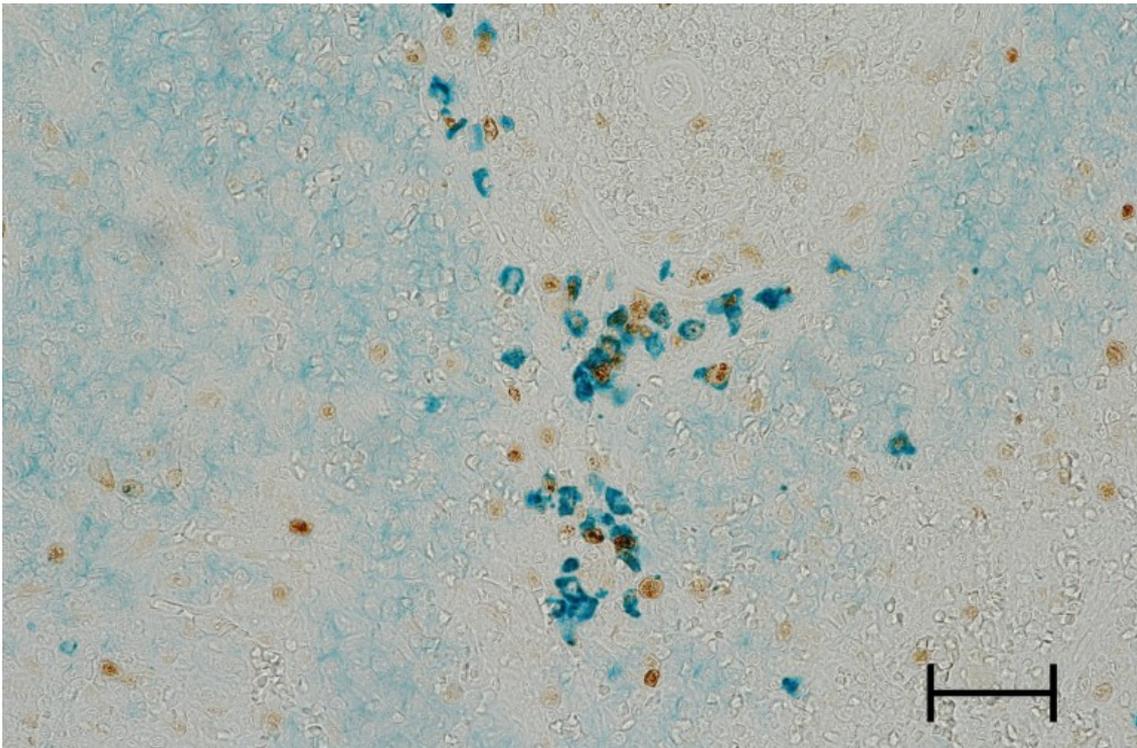


Abbildung 22 (aus Abb. 21): Nachweis von MIB-5 (DAB) und intrazellulärem IgM (HistoGreen).

Der Maßstabsbalken entspricht 50µm.

In beiden Lokalisationen bildeten die IgM-positiven Zellen überwiegend lokale Ansammlungen und traten nicht gleichmäßig verteilt auf (Abb. 21, 22). Die ungleichmäßige Verteilung der Zellen in der äußeren PALS war vermutlich auf MZBCs zurückzuführen, die bereits an ihrem Abgang aus der Zentralarterie von großen Haufen aus Plasmablasten und Plasmazellen umgeben waren. Manche - nicht jedoch alle - Follikel zeigten an ihrer Basis eine Reihe von Plasmablasten/zellen, die anscheinend in der PALS lokalisiert war. Erstaunlicherweise fanden sich verstreute nicht proliferierende Plasmazellen in fast allen Follikeln außerhalb der Keimzentren (Abb. 21, 23). Zusammengefasst zeigen die Befunde, dass in der äußeren PALS und in den MZBCs sowohl IgM⁺-Plasmablasten wie auch IgM⁺-Plasmazellen wandern.

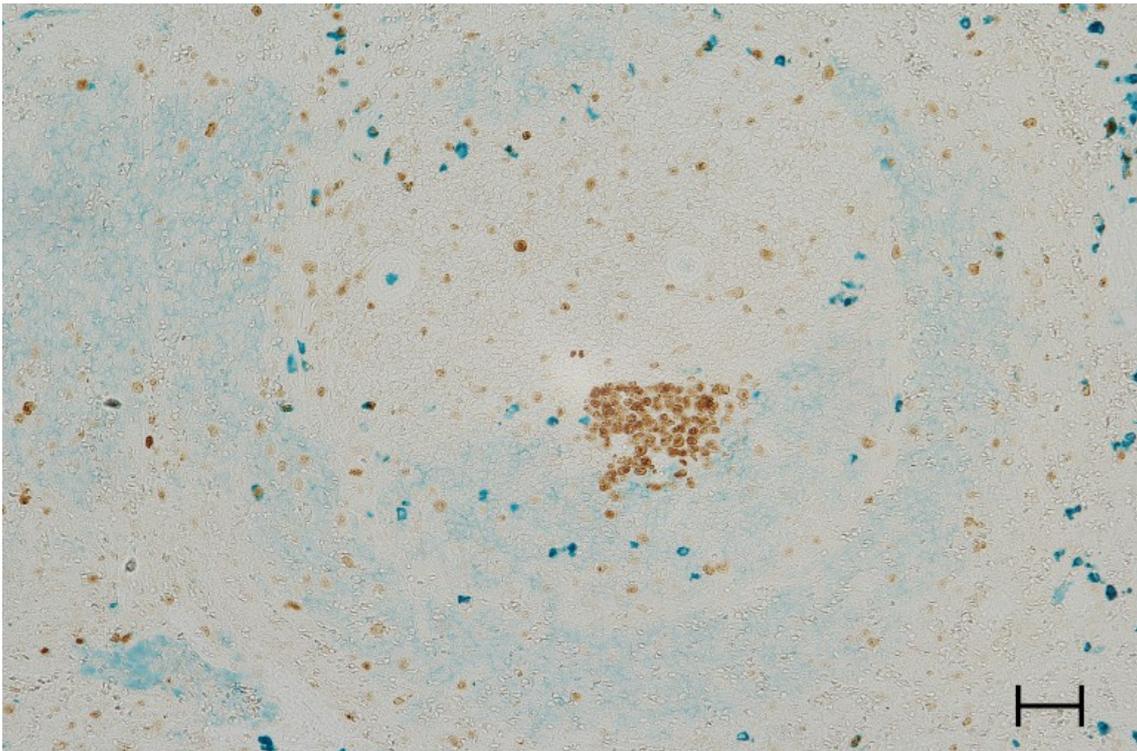


Abbildung 23: Nachweis von MIB-5 (DAB) und intrazellulärem IgM (HistoGreen) bei einem Sekundärfollikel.

Der Maßstabsbalken entspricht 50µm.

3.2.4 Ox33 (CD45RA; Abb. 24)

Der Antikörper Ox33 (Woollett et al., 1985) zeigt ein ähnliches Färbemuster wie der zuvor vorgestellte B-Zell-spezifische AK MARD-3. Es werden die B-Zellen in MZ und Follikeln positiv dargestellt. Der MS bleibt ausgespart. In der RP finden sich vereinzelt positive Zellen und Zellhaufen in der Umgebung von Arteriolen. Auch im Bereich der oberflächlichen T-Zell-Zone finden sich einzelne positive Zellen.

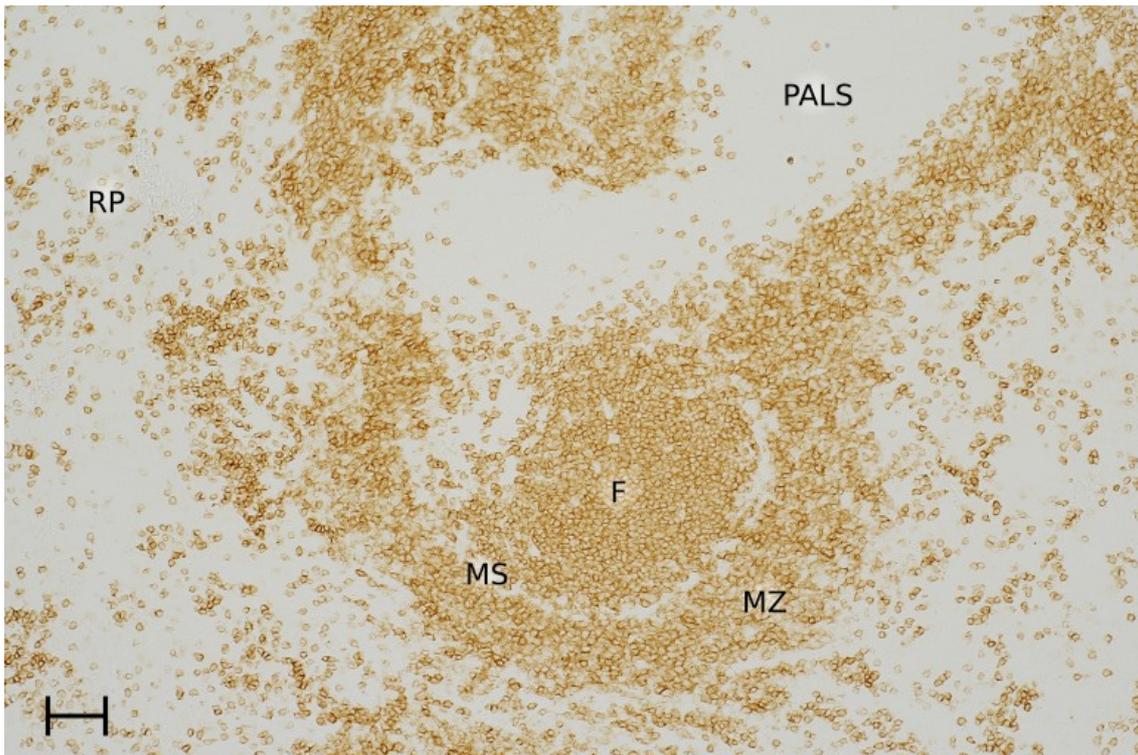


Abbildung 24: Nachweis von Ox33 (DAB) (Cryo, Einfachfärbung). (MZ) Marginalzone, (MS) Marginalsinus, (PALS) Periarterielle Lymphatische Scheide, (RP) Rote Pulpa, (F) Follikel. Der Maßstabsbalken entspricht 50µm.

Tabelle 4: Phänotyp und Lokalisation von B-Lymphozyten

AK	äPALS	Follikel	MZ
His57	+/-	+	++
MARD-3	+/-	++	+/- ^{a)} + ^{a)}
IgM	?	++	++
Ox33	+/-	++	++
His52 ^{b)}	-	+	+

^{a)} Zwei verschiedene Zellpopulationen

Legende: (äPALS) äußere PALS, (++) stark positiv, (+) positiv, (-) negativ, +/- vereinzelte positive Zellen, (?) Keine Aussage möglich.

^{b)} Beschreibung des mAb und seines Färbemusters s. 3.5.1

3.3 Erythrozyten (Tabelle 5)

3.3.1 His 49 (Erythrozyten; Abb. 25) und DAB-Färbung (Abb. 26)

Der mAb His 49 detektiert ein bisher unbekanntes Antigen von Erythrozyten (Hermans und Opstelten, 1991).

Der Erythrozyten enthaltende, deutlich positive Bereich entspricht der von Ox43 angefärbten MZ und der RP. PALS und Follikel werden nicht angefärbt.

Auch durch eine DAB-Färbung von formalinfixierten Milz-Paraffinschnitten ohne vorherige Vorbehandlung mit Glucoseoxidase lassen sich Erythrozyten darstellen. Wie in der Färbung mit His49 fällt dabei die dichte Verteilung von Erythrozyten in der MZ auf.

Aus diesen Befunden lässt sich schließen, dass die MZ einen Teil des offenen Milzkreislaufs darstellt.

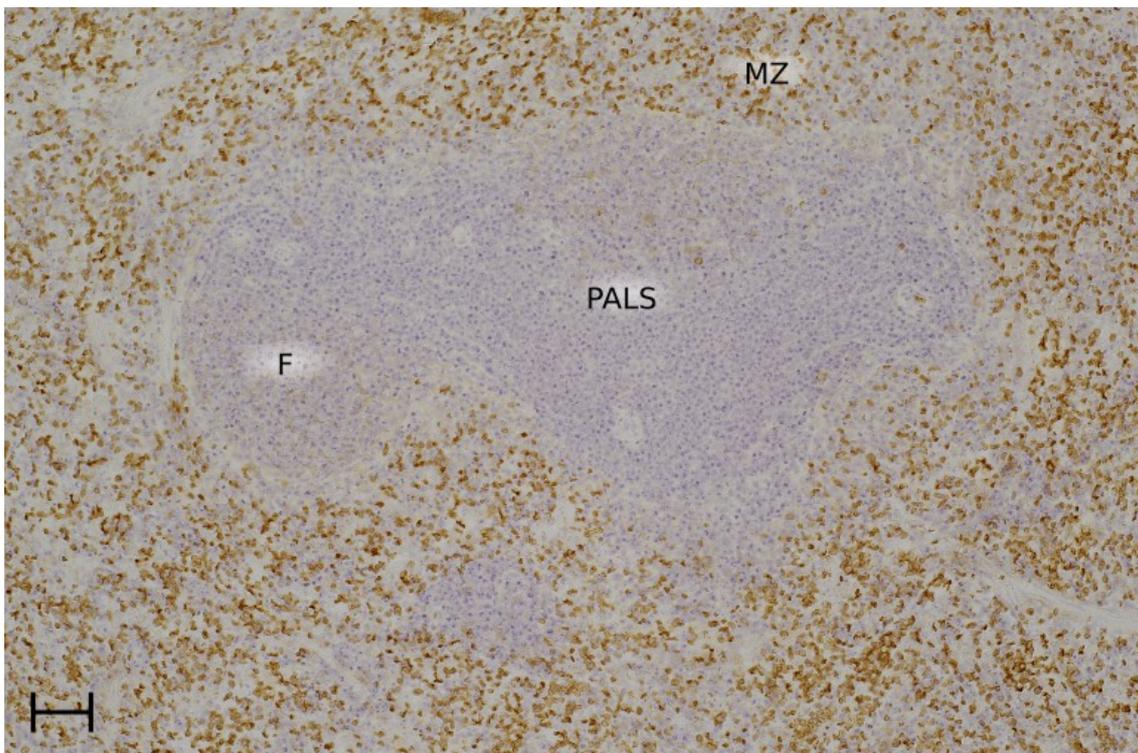


Abbildung 25: Nachweis von His49 (Cryo, Einfachfärbung mit DAB, KF). (MZ) Marginalzone, (PALS) Periarterielle Lymphatische Scheide, (F) Follikel. Der Maßstabsbalken entspricht 50µm.

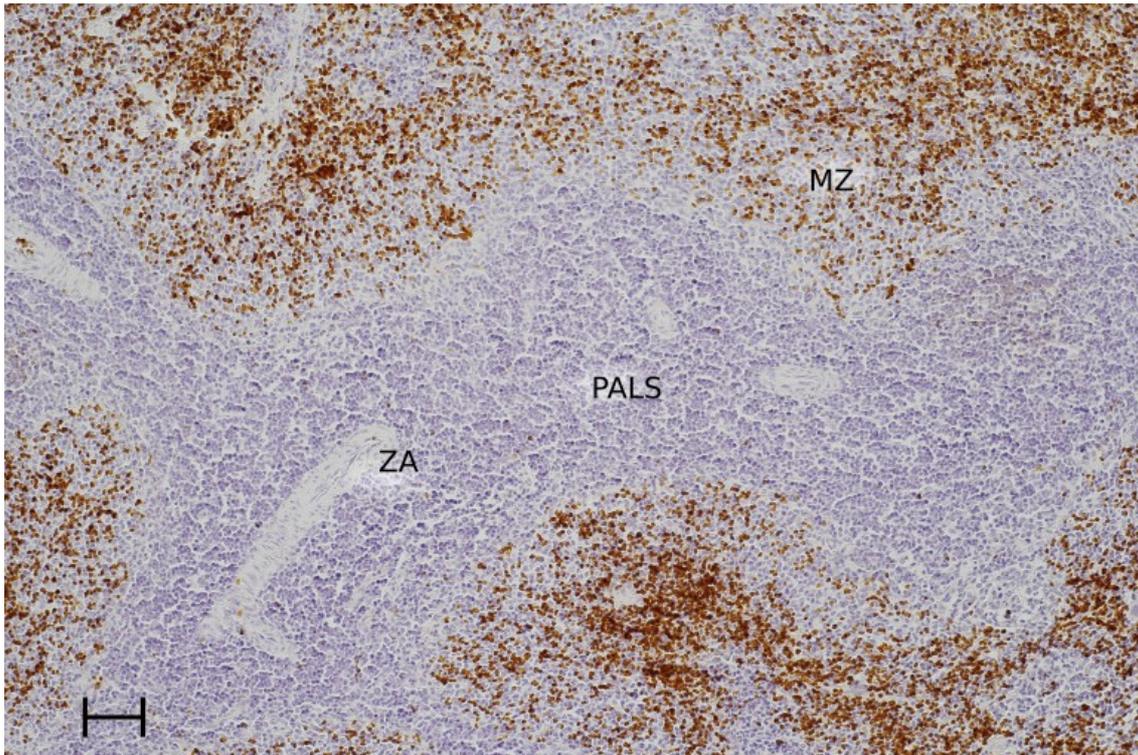


Abbildung 26: DAB-Färbung (Paraffin, ohne Vorbehandlung, Einfachfärbung, KF). (ZA) Zentralarterien, (PALS) Periarterielle Lymphatische Scheide, (MZ) Marginalzone. Der Maßstabsbalken entspricht 50µm.

3.4 Granulozyten (Tabelle 5)

3.4.1 RP-1 (Neutrophile Granulozyten; Abb. 27)

Mit dem AK RP-1 lassen sich neutrophile Granulozyten darstellen (Gotoh et al., 1986). Das Antigen ist bisher nicht charakterisiert. Vereinzelt oder zum Teil in Gruppen angeordnete Granulozyten finden sich in der RP, sowie in deutlich geringerer Anzahl fokal in der MZ. Auch dies weist darauf hin, dass die MZ zum offenen Kreislaufsystem der RP gehört.

PALS und Follikel enthalten keine RP-1-positiven Zellen.

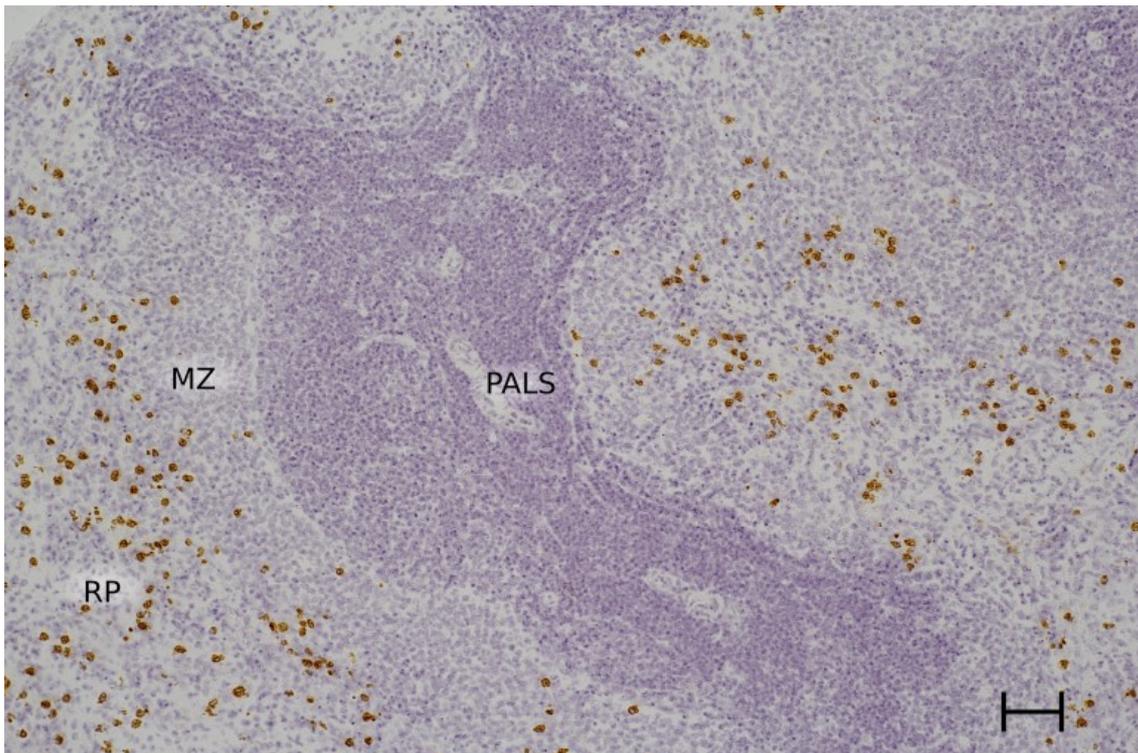


Abbildung 27: Nachweis von RP-1 (DAB) (Cryo, Einfachfärbung, KF). (MZ) Marginalzone, (PALS) Periarterielle Lymphatische Scheide, (RP) Rote Pulpa. Der Maßstabsbalken entspricht 50µm.

Tabelle 5: Lokalisation von Erythrozyten u. Granulozyten

AK	PALS	Follikel	MZ	RP
His49	-	-	+	++
RP-1	-	-	+/-	+

Legende: (MZ) Marginalzone, (RP) Rote Pulpa. (++) stark positiv, (+) positiv, (-) negativ, +/- vereinzelte positive Zellen.

3.5 Endothelzellen

3.5.1 His52 (RECA-1; Abb. 28)

Mithilfe des mAb His52 stellen sich Gefäßendothelien in Arterien, Venen und Kapillaren in der RP und WP dar (Duijvestijn et al., 1992). Das Antigen ist bisher nicht charakterisiert worden.

Arteriell-Endothel färbt sich stärker als venöses. Die Sinusendothelien in der RP sind schwach positiv.

T-Zell-Zonen sind ungefärbt mit Ausnahme schwach gefärbter Strukturen, bei denen es sich um IDCs handeln könnte.

His52 färbt neben den folliculären B-Zellen auch die MZ-B-Zellen, wobei letztere eine kräftige Färbung zeigen. Damit ähnelt das Färbeverhalten von

His52 deutlich dem von His57 (s. dort).

Nicht eindeutig kann der Bereich des MS charakterisiert werden: an manchen Stellen scheinen Kapillaren getroffen zu sein; ein kontinuierliches Gefäßgeflecht lässt sich allerdings nicht darstellen.

In der RP ist zudem eine schwach gefärbte Subpopulation von Makrophagen sichtbar. Auch Monozyten und Lymphozyten könnten in der RP schwach sichtbar sein.

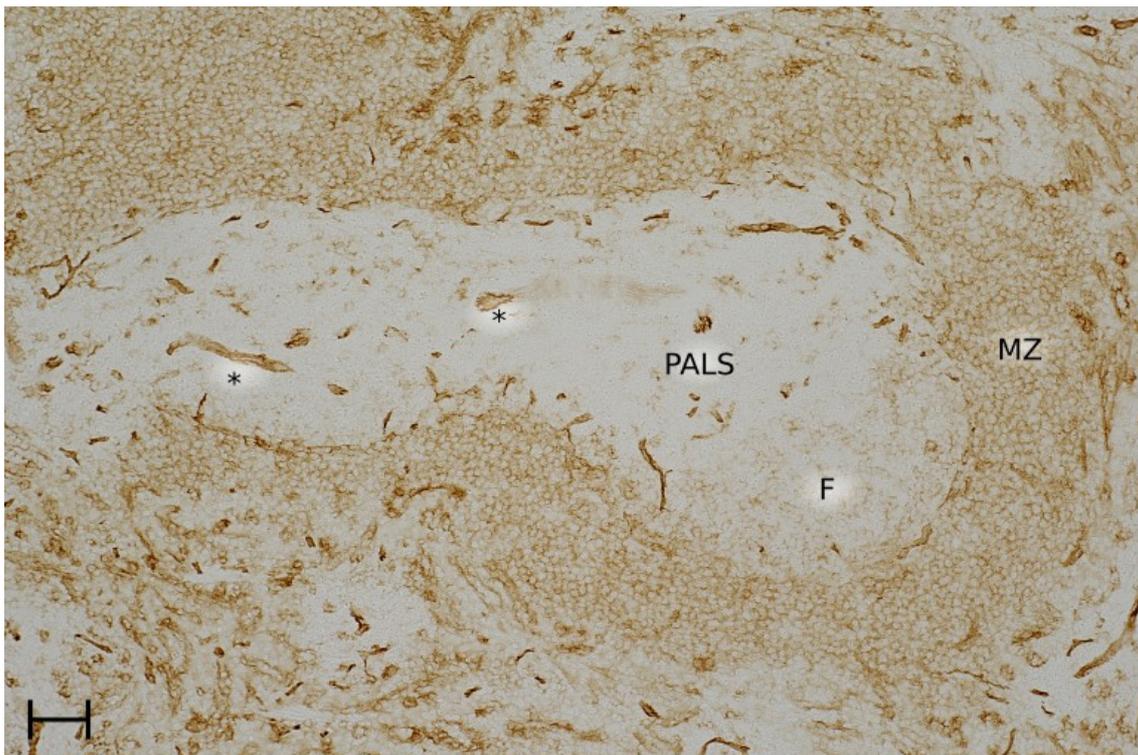


Abbildung 28: Nachweis von His52 (DAB) (Cryo, Einfachfärbung). (MZ) Marginalzone, (PALS) Periarterielle Lymphatische Scheide, (F) Follikel, (*) Gefäßanschnitte. Der Maßstabsbalken entspricht 50µm.

3.6 Makrophagen (Tabelle 6)

3.6.1 ED2 (CD163; Abb. 29)

ED2 markiert Makrophagen der RP (Dijkstra et al., 1985). MZM und MMM werden nicht angefärbt. Vereinzelt werden auch Makrophagen an der Grenze der PALS zur MZ schwach angefärbt. Zusätzlich finden sich extrem schwach gefärbte Zellen innerhalb der PALS. Dies weist darauf hin, dass in der PALS zusätzlich zu IDCs auch Makrophagen vorkommen. Einen ähnlichen Hinweis gibt die Darstellung von ED3 nach Tyramidverstärkung (S. 62f.).

Auch in der T-Zell-Zone werden vereinzelt Zellen schwach angefärbt. Das Vorkommen von Makrophagen auch in dieser Zone lässt sich somit nicht

ausschließen.

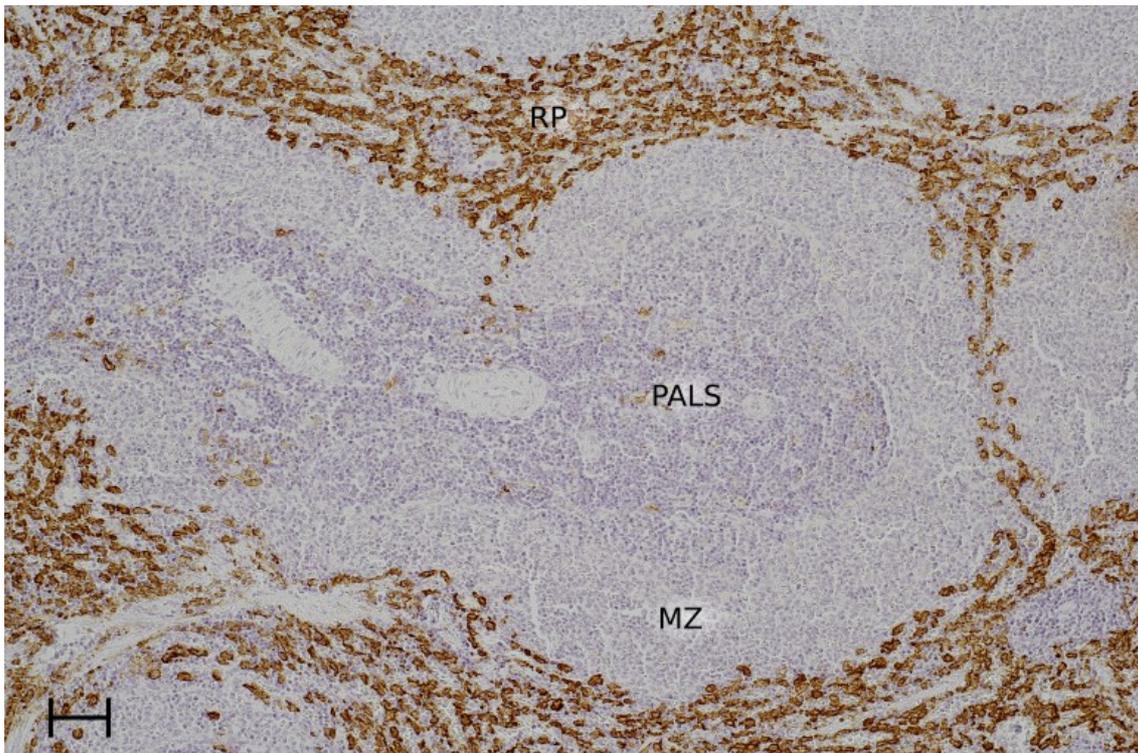


Abbildung 29: Nachweis von ED2 (DAB) (Cryo, Einfachfärbung, KF). (RP) Rote Pulpa, (PALS) Periarterielle Lymphatische Scheide, (MZ) Marginalzone. Der Maßstabsbalken entspricht 50µm.

3.6.2 ED3 (CD169 / Sialoadhesin; Abb. 30)

Der AK ED3 färbt deutlich die MZM sowie die an der Innenwand des MS liegenden MMM (Dijkstra et al., 1985).

Auch eine Subpopulation von RP-Makrophagen wird etwas schwächer angefärbt. Zusätzlich lassen sich verzweigte Zellen in der PALS schwach darstellen.

Lymphozyten sind mithilfe von ED3 nicht nachweisbar.

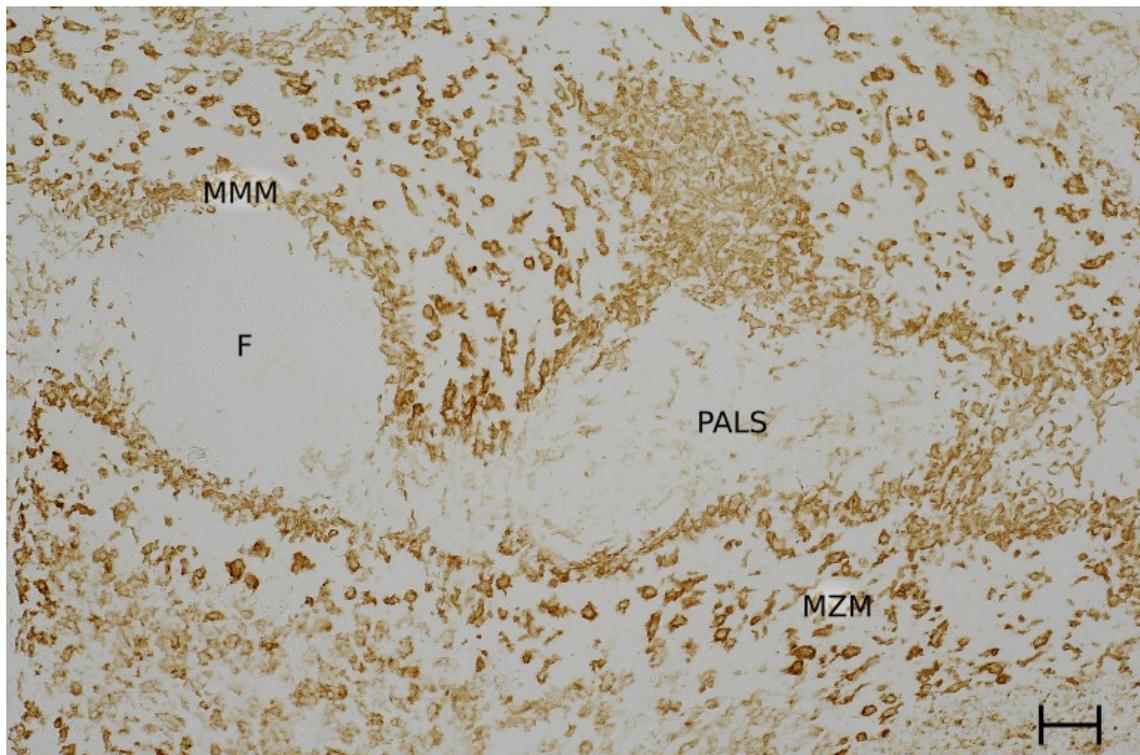


Abbildung 30: Nachweis von ED3 (DAB) (Cryo, Einfachfärbung, nach Tyramidverstärkung). (MMMs) Marginale Metallophile Makrophagen am MS, (MZMs) Marginalzonenmakrophagen in der MZ, (F) Follikel, (PALS) Periarterielle lymphatische Scheide. Der Maßstabsbalken entspricht 50µm.

Tabelle 6: Phänotyp und Lokalisation von Makrophagen

AK	MZM	MMM	RPM	Sonstiges
ED2	-	-	++	
ED3	++	++	+/-	

Legende: (MZM) Marginalzonen-Makrophagen, (MMM) Marginale Metallophile Makrophagen, (RPM) Rote Pulpa Makrophagen. (++) stark positiv, (+) positiv, (-) negativ, +/- vereinzelte positive Zellen.

3.7 T-Zellen (Tabelle 7)

3.7.1 Ox8 (CD8, alpha-Kette, Abb. 31)

Mithilfe von Ox8 lassen sich die CD8⁺-zytotoxischen T-Zellen darstellen (Duarte et al., 1982; Brideau et al., 1980; Barclay, 1981).

In der Färbung zeigt sich eine deutlich angefärbte PALS mit einer hohen Zahl von Zellen, die jedoch ungefärbte Zwischenräume freilassen.

Nur vereinzelte angefärbte Zellen finden sich in den Follikeln. Auch in der MZ treten die Zellen nur vereinzelt auf, scheinen jedoch etwas häufiger zu sein als in den Follikeln.

In der RP färben sich mehr Zellen als in den Follikeln; insgesamt liegen die Zellen aber nicht so dicht beieinander wie in der PALS. In der RP gibt es Ansammlungen von CD8⁺-T-Zellen insbesondere um Blutgefäße herum.

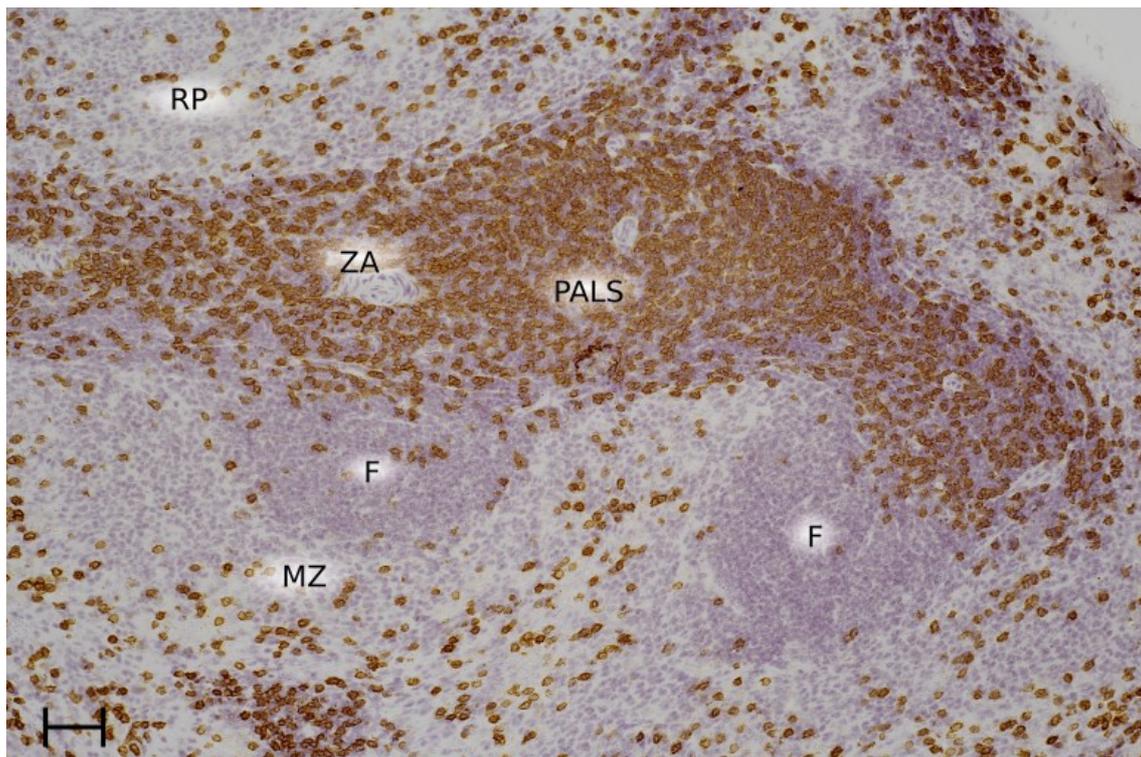


Abbildung 31: Nachweis von Ox8 (DAB) (Cryo, Einfachfärbung, KF). (F) Follikel, (MZ) Marginalzone, (ZA) Zentralarterie, (PALS) Periarterielle Lymphatische Scheide, (RP) Rote Pulpa. Der Maßstabsbalken entspricht 50µm.

3.7.2 Ox34 (CD2; Abb. 32)

Durch den Antikörper Ox34, welcher CD2 darstellt, lassen sich ebenfalls überwiegend T-Zellen darstellen (Jefferies et al., 1985; Williams et al., 1987).

So wird deutlich die PALS angefärbt. Die Follikel sind negativ, aber einzelne Zellen werden angefärbt. Dabei handelt es sich möglicherweise um T-Helfer-Zellen. In der MZ werden einzelne längliche, teilweise verzweigte und zusätzlich rundliche Zellen sichtbar. Der Morphologie nach werden somit wahrscheinlich MZM angefärbt. Im Bereich des MS zeigt sich eine deutliche Färbung, bei der es sich um MMM handeln könnte. Aus diesem Grund wurde eine Doppelfärbung mit dem AK ED3 durchgeführt, der CD169 auf MZM und MMM nachweist (siehe unten).

Die RP stellt sich mit einer Vielzahl angefärbter Zellen dar, typische Makrophagen der RP stellen sich nicht dar.

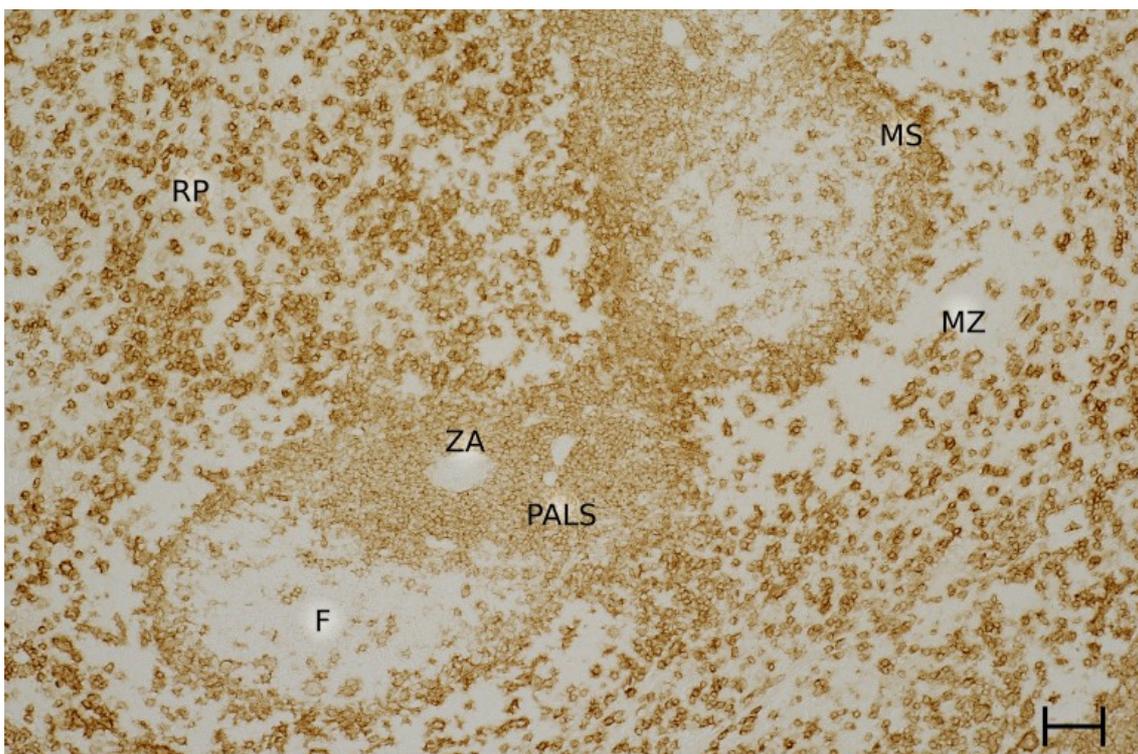


Abbildung 32: Nachweis von Ox34 (DAB) (Cryo, Einfachfärbung). (F) Follikel, (MZ) Marginalzone, (MS) Marginalsinus, (ZA) Zentralarterie, (PALS) Periarterielle lymphatische Scheide, (RP) Rote Pulpa. Der Maßstabsbalken entspricht 50µm.

3.7.2.1 Doppelfärbung ED3 und Ox34 (Abb. 33)

Nach Darstellung der MZM und MMM durch ED3 lassen sich im Bereich des MS und der MZ keine größeren länglichen oder verzweigten Zellen nachweisen. Damit ist bewiesen, dass das Ox34-Antigen nicht nur von T-Zellen, sondern auch von beiden Makrophagenarten exprimiert wird. ED3 färbt zusätzlich zwei Zellarten schwach an: RP-Makrophagen und verzweigte Zellen in der PALS. Dies wird besonders nach Tyramid-Verstärkung der ED3-Färbung deutlich. Ox34 positive Zellen, die keine Makrophagen darstellen, finden sich auch in der MZ. Hier scheinen sie um die Follikel herum weniger dicht aufzutreten als im Bereich um die PALS herum.

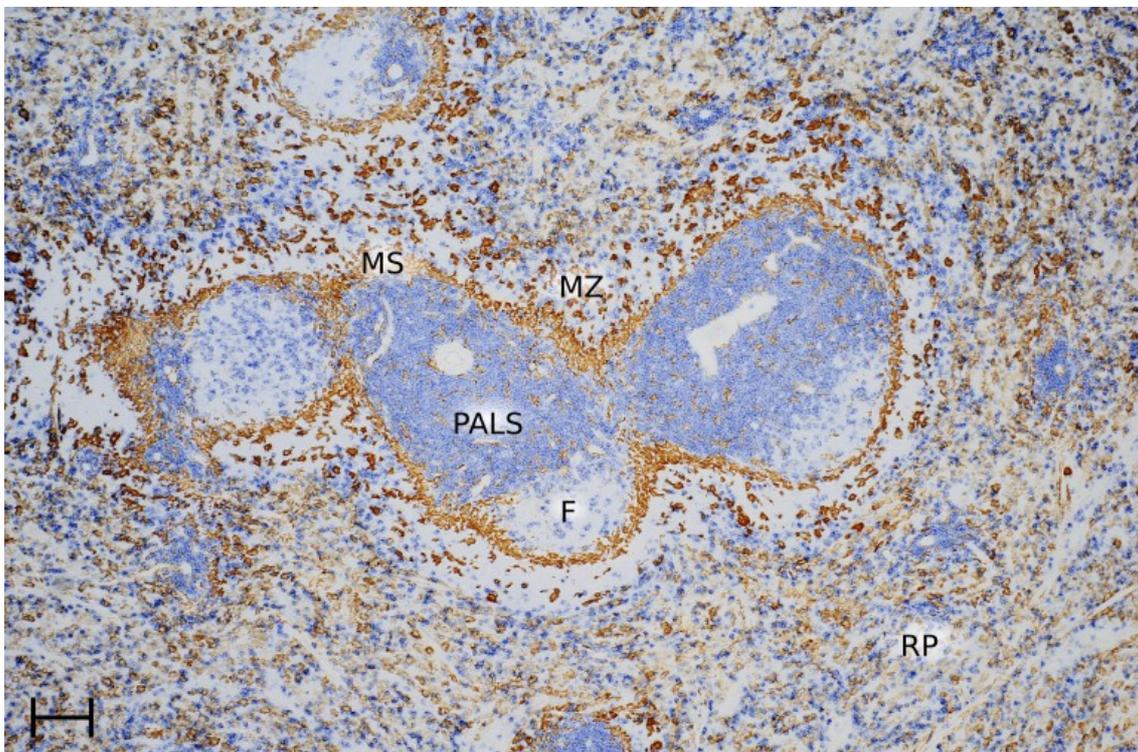


Abbildung 33: Nachweis von ED3 (DAB) und Ox34 (Enzo Blue) (Cryo, Doppelfärbung, KF). (F) Follikel, (MZ) Marginalzone, (MS) Marginalsinus, (PALS) Periarterielle Lymphatische Scheide, (RP) Rote Pulpa. Der Maßstabsbalken entspricht 50µm.

3.7.3 R73 (alpha/beta TCR; Abb. 34)

R73 weist den alpha/beta T-Zellrezeptor nach und färbt alle T-Zellen. Die PALS stellt sich prominent dar. Auch in den Follikeln, in der MZ und in der RP werden einzelne T-Zellen angefärbt. In der MZ um Follikel herum scheinen weniger R73-positive T-Lymphozyten zu liegen als um die PALS herum. Bei einigen Follikeln ist der Übergang zwischen der PALS und den follikulären T-Zellen

mehr oder weniger fließend. Die Menge der folliculären T-Zellen unterscheidet sich bei den einzelnen Follikeln.

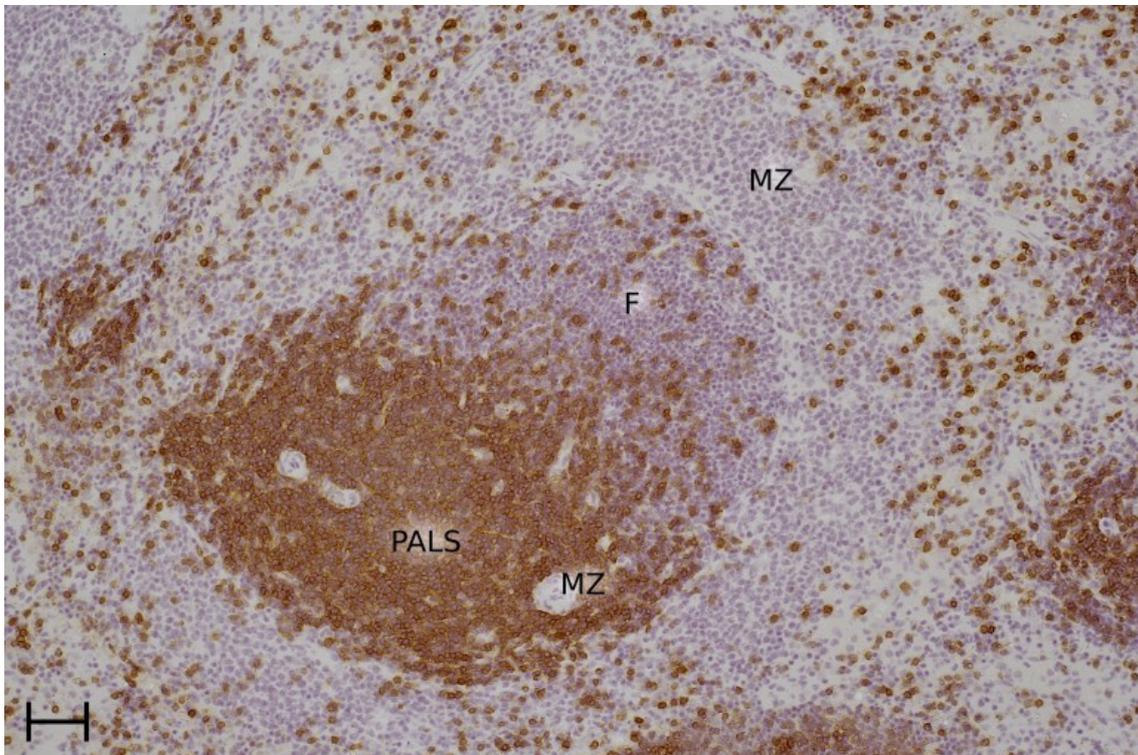


Abbildung 34: Nachweis von R73 (DAB) (Cryo, Einfachfärbung, KF). (F) Follikel, (MZ) Marginalzone, (ZA) Zentralarterie, (PALS) Periarterielle lymphatische Scheide. Der Maßstabsbalken entspricht 50µm.

Tabelle 7: Lokalisation verschiedener T-Lymphozyten-Populationen

AK	PALS	Follikel	MZ	Sonstiges
Ox8	+	- ^{a)}	+/- ^{b)}	
Ox34	++	+/-	+/- ^{b)}	MZM, MMM
R73	++	+/-	+/- ^{b)}	

^{a)} 2-5 Zellen pro Follikel

^{b)} in MZ um Follikel herum selten

Legende: (PALS) Periarterielle Lymphatische Scheide, (MZ) Marginalzone, (MZM) Marginalzonen-Makrophagen, (MMM) Marginale Metallophile Makrophagen (++) stark positiv, (+) positiv, (-) negativ, +/- vereinzelte positive Zellen.

4. DISKUSSION

Die vorliegenden Untersuchungen geben eine Übersicht über die Verteilung von Stromazellen, T- und B-Lymphozyten, Makrophagen, Granulozyten und Erythrozyten in der Milz von adulten männlichen LEW-Inzuchtratten und analysieren die Verteilung von IgM-positiven Plasmablasten/Plasmazellen.

Im Vordergrund der Arbeit steht die Zellzusammensetzung der MZ, eines speziellen B-Lymphozyten-Kompartiments bei Ratten und Mäusen (Kraal, 1992). In humanen Milzen kommt eine MZ als abgrenzbares Kompartiment nicht vor (Steiniger et al., 2006; Steiniger, 2015), obwohl eine Erkrankung ("Marginalzonen-Lymphom") nach ihr benannt ist. Der Phänotyp der follicelumgebenden Stromazellen ist bei Menschen gut charakterisiert (Steiniger 2014, 2015). Mäuse besitzen im Vergleich zu Ratten nur eine sehr schmale MZ. Obwohl verschiedene Arbeitsgruppen die Stromazellen in Milzen von Mäusen untersucht haben (Übersicht bei Golub et al., 2018), sind bis jetzt bei dieser Spezies – ähnlich wie bei Ratten – keine für die MZ spezifischen Stromazellarten definiert worden.

Bei Ratten ist die MZ jedoch im Hinblick auf den Phänotyp ihrer B-Lymphozyten, Stromazellen und Makrophagen eindeutig als eigenständiges Kompartiment in der Milz aufzufassen. Dies wird durch neue Befunde über die erwähnten Zellarten in der vorliegenden Arbeit unterstützt. Die Stromazellen der MZ exprimieren offenbar Pan-Laminin und das unbekannte Antigen, das vom mAb Ox43 detektiert wird. Sie sind jedoch negativ für VCAM-1 und SMA. Durch verbesserte immunhistologische Nachweistechiken wurden somit neue Informationen über die MZ gewonnen, welche die Daten aus den Erstbeschreibungen (Tabelle 1) vieler monoklonaler Antikörper erweitern.

Die Befunde zeigen, dass die Zellzusammensetzung der MZ bei Ratten aufgrund ihrer Zellzusammensetzung eine Mischung aus weißer und roter Pulpa darstellt. Die MZ ist mit der RP verbunden und umfasst - wenn auch in eingeschränkter Weise - einen Teil des offenen Milzkreislaufs. Dies kommt sowohl durch die Anwesenheit von Erythrozyten und Granulozyten wie auch

des Ox43-Antigens zum Ausdruck. Andererseits beherbergt die MZ neben einer Minderzahl kleiner wandernder B-Lymphozyten große Mengen einer speziellen B-Lymphozytenart, der MZ B-Lymphozyten, die sich auch in Follikeln findet. Diese Zellen exprimieren die Zielstrukturen der mAbs His57 und His52 sowie eine reduzierte Menge von Zelloberflächen-IgD. Die Stromazellen der MZ unterscheiden sich phänotypisch von allen bisher nachweisbaren Stromazellen der Rattenmilz. Gleiches gilt auch für die von anderen Arbeitsgruppen gut charakterisierten speziellen Makrophagen der MZ (Dijkstra et al., 1985). Wandernde Plasmablasten und Plasmazellen scheinen die MZ zu meiden. Die MZ bleibt somit bei Ratten mangels Definition ihrer Stromazellen ein rätselhafter Raum, obwohl der Name "Marginalzone" durch Untersuchungen an Ratten geprägt wurde. Zur Klärung des Rätsels könnte die Charakterisierung des bisher unbekanntes Zielmoleküls des mAb Ox43 beitragen. Es sollte zusätzlich überprüft werden, ob MZ-Stromazellen bei Ratten Moleküle tragen, die bei anderen Spezies, z.B. bei Menschen, auf oberflächlichen Stromazellen der WP vorkommen, z.B. CD141 oder Zytokeratin 8/18.

Verwendete Methoden

Ein Nachteil von immunhistologischen Untersuchungen an Ratten besteht darin, dass ein großer Teil der nachgewiesenen Moleküle bisher nicht biochemisch charakterisiert worden ist. Dies ist auf den Bedeutungsverlust von Ratten als Versuchstiere in der Immunologie zurückzuführen und dürfte sich, wie in der Einleitung beschrieben, durch neue Methoden der Genmanipulation in Zukunft ändern. Darüberhinaus stammen die meisten mAbs aus einer Zeit, in der Immunhistologie auf Paraffinschnitten noch unbekannt war. Daher ist die Mehrzahl dieser mAbs nicht paraffingängig oder kann nur mit sehr speziellen enzymatischen Vorbehandlungen auf Paraffinschnitten eingesetzt werden. Grundsätzlich ist dies kein Nachteil, da Cryoschnitte den Goldstandard für immunhistologische Techniken repräsentieren. Die Verwendung von Cryoschnitten setzt jedoch der Auflösung sehr feiner Details (z.B. bei verzweigten Stromazellen) Grenzen. Da Cryoschnitte nur minimal in Alkohol fixiert werden, ist die Erhaltung der meisten Membranantigene optimal. Zytoskelett-Proteine, lösliche intrazelluläre Proteine und vor allem lipidverankerte Membranproteine sind jedoch durch Auswaschen gefährdet.

Die dargestellten Befunde wurden mit Ausnahme der Doppelfärbung für Ki-67 und intrazelluläres IgM, die sich auf sechs Individuen bezieht, an einzelnen Tieren des Inzuchtstamms LEW erhoben. Dies erschien möglich, weil für fast alle untersuchten Antikörper Vorbefunde an mindestens drei weiteren Tieren aus eigenen Vorarbeiten der Arbeitsgruppe, aus eigenen Publikationen (Steiniger und van der Meide, 1993; Steiniger und Barth, 2000; Steiniger, 2015) oder aus den Publikationen anderer Arbeitsgruppen (Dijkstra et al., 1985; Duijvestijn et al., 1992; Dammers et al., 1999; Woollett et al., 1985; Peter M. Dammers and Kroese, 2005; Berg et al., 1989; Brideau et al., 1980) vorlagen. In sämtlichen Fällen ergab sich eine übereinstimmende Beschreibung der Immunreaktivität. Eine Ausnahme bildeten Antikörper wie Ox43 (Robinson et al., 1986), die in der Erstbeschreibung mit weniger verstärkenden Systemen untersucht worden waren. Die Ergebnisse beziehen sich nur auf die untersuchten Rattenstämme LEW/Ztl und LEW/OrlRj, die als Inzuchtstämme im zentralen Tierlabor der Medizinischen Hochschule Hannover bzw. bei dem kommerziellen Züchter Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) unter spezifiziert pathogenfreien Bedingungen gehalten wurden. In Voruntersuchungen wurden bei beiden LEW Substämmen keine Expressionsunterschiede der untersuchten Antigene gefunden. Nach Möglichkeit wurden ausgewachsene Männchen im Alter von mindestens zwei, optimalerweise von drei Monaten, untersucht. Bis zum Alter von sechs Monaten ließen sich in unpublizierten Voruntersuchungen bei den meisten der untersuchten Antigene keine altersabhängigen Verteilungsunterschiede bei beiden Substämmen nachweisen.

Stromazellen in der WP

In der weißen Pulpa von Mäusen wurden bisher drei Stromazellarten (FRCs, FDCs und MRCs) definiert (Golub et al., 2018). Es ist anzunehmen, dass diese drei Zellarten auch bei Ratten existieren und die vier eingesetzten Antikörper (anti-ICAM-1, anti-VCAM-1, anti-Pan-Laminin und anti-Glattnuskel alpha-Aktin) diese Zellarten (Tabelle 3) detektieren.

So lässt der mAb gegen ICAM-1 bei den Stromazellen ausschließlich FRCs erkennen. Der mAb gegen VCAM-1 zeigt FRCs und FDCs. In Sekundärfollikeln

werden FDCs in der hellen Zone des Keimzentrums besonders stark gefärbt. Mit Hilfe von anti-Pan-Laminin lassen sich grobmaschig angeordnete Netzwerke in der PALS und feinere Netzwerke in Follikeln sowie die Umgebung des MS darstellen. Ein besonders feines Netzwerk ist in der MZ zu erkennen. Glattmuskelaktin kommt in FRCs und MRCs vor, nicht jedoch in FDCs oder in der MZ.

Die eigenartige Verteilung von VCAM-1 lässt sich am besten erklären, wenn man annimmt, dass – in Analogie zu Menschen – alle scheinbaren Primärfollikel in der Rattenmilz früh in der Ontogenese Keimzentren besessen haben. Diese Keimzentren könnten sich anschließend zurückgebildet haben, sodass die ursprünglich in der hellen Zone besonders dichten FDCs eng zusammengedrückt sind. Eigenartigerweise scheint das von den FDCs produzierte Laminin, bzw. die sehr dünnen retikulären Fasern des Follikels, bei der Rückbildung von Sekundärfollikeln nicht zusammenzufallen. Leider existieren bisher keine Untersuchungen darüber, ob alle Follikel von Rattenmilzen Hinweise auf frühere Keimzentren zeigen.

Ein Ziel der Untersuchungen war es, die lokalen Stromazellen der Marginalzone näher zu charakterisieren. Dies erwies sich jedoch als unerwartet problematisch. Die Färbung mit anti-Pan-Laminin zeigt, dass es in der MZ spezielle Stromazellen geben muss, die ein feines Netzwerk aus Extrazellulärmatrix herstellen (Abb. 5). Diese Zellen unterscheiden sich von FRCs der T-Zellzone, von FDCs und von der Mehrzahl der Stromazellen in der RP dadurch, dass sie kein VCAM-1 exprimieren (Abb. 4). ICAM-1 lässt sich bei Ratten wegen starker Expression durch sämtliche B-Lymphozyten weder zur Darstellung von Stromazellen in Follikeln noch in der MZ benutzen (Abb. 3). Der Nachweis von SMA zeigt zusätzlich zu FRCs eine sehr dünne Schicht verzweigter Zellen an der Oberfläche von Follikeln (Abb. 6), die auf der follikulären Seite des MS zu liegen scheint. Der überwiegende Teil der MZ ist frei von SMA-positiven Zellen. Die SMA-positiven Stromazellen an den Follikeloberflächen in Rattenmilzen dürften den von Katakai et al. (Katakai et al., 2008; Katakai, 2012) für Mausmilzen beschriebenen MRCs entsprechen. MRCs sind bisher nur für Mäuse definiert. Bei humanen Milzen unterscheidet

sich die Expression von SMA erheblich von derjenigen bei Ratten und Mäusen: Der mAb asm-1 stellt bei Menschen neben inneren und vor allem oberflächlichen FRCs in der T-Zellzone eine dicke Schicht verzweigter Stromazellen an der Oberfläche von Sekundärfollikeln dar (Steiniger et al., 2001; Steiniger et al., 2014), die außerhalb der Mantelzone liegen. Diese Zellen könnten MRCs entsprechen. Ihre Lage ist jedoch wegen des Fehlens eines Marginalsinus bei Menschen schwer zu vergleichen.

Die vorliegende Arbeit führt somit zunächst nur zu einer negativen Definition der speziellen Fibroblasten in der MZ von Ratten, die sich durch das Fehlen (oder die minimale Expression) von charakteristischen Antigenen eindeutig von FDCs und FRCs unterscheiden. Dies entspricht den Befunden von van den Berg et al., die versuchten, mAbs gegen Stromazellen sekundärer lymphatischer Organe bei Ratten herzustellen. Keiner der beschriebenen Antikörper reagierte mit Stromazellen der MZ (van den Berg et al., 1989). Auch bei Mäusen ist es bisher weder Katakai et al. (Katakai et al., 2008; Katakai, 2012) noch anderen Autoren (Fasnacht et al., 2014) gelungen, die Stromazellen der MZ zu charakterisieren. Aus diesem Grund ist zu vermuten, dass die Zellen einen sehr ungewöhnlichen spezies-spezifischen Phänotyp besitzen, auf den es bisher fast keine Hinweise gibt.

Auf die Darstellung von Thy-1 (CD90) wurde in der vorliegenden Arbeit verzichtet, da dieses Molekül, das bei Mäusen, Ratten und Menschen u.a. auf zahlreichen Fibroblasten vorkommt, einen Lipidanker besitzt. Es wurde deshalb angenommen, dass es sowohl in Isopropanol-fixierten Kryoschnitten wie auch in Paraffinschnitten nicht oder nur sehr schlecht nachweisbar sein würde.

Ein sehr interessantes Färbemuster in der MZ und außerhalb zeigt der mAb Ox43 (Robinson et al., 1986). Dieser Antikörper färbt die Membran von Endothelzellen in großen Gefäßen und Kapillaren, von Makrophagen und von Parenchymzellen in verschiedenen Organen. Die Färbung von Endothelzellen und Makrophagen ist jedoch in der Milz nicht zu erkennen, weil die gesamte RP inklusive der MZ von Ox43-reaktivem Material ausgefüllt ist. Bei höherer Vergrößerung und hoher Verdünnung von Ox43 ist in der MZ ein immunreaktives Maschenwerk zu erkennen, das an die Färbung mit anti-Pan-

Laminin erinnert. Vergleicht man die Expression des Ox43-Antigens in Pankreas, Leber, Herz, Niere, Gehirn und Milz (Abb. 7-12), dann liegt der Schluss nahe, dass es sich um ein Molekül handelt, das einerseits in verschiedenen Zellarten membranständig auftritt, andererseits in der Milz zusätzlich an Bestandteile der extrazellulären Matrix gekoppelt ist. Ox43 dürfte somit neben der membranständigen auch in einer löslichen Form auftreten und in dieser Form im Blut zirkulieren. Die Bindung an extrazelluläre Matrix ist offenbar organspezifisch, da Ox43-Reaktivität im Disse-Raum der Leber nicht vorkommt (Abb. 11), obwohl dieser Raum - ähnlich wie die RP - Blutplasma und retikuläre Fasern enthält.

In der Milz stellt Ox43 den gesamten offenen Kreislauf inklusive der MZ dar.

An der Oberfläche von Follikeln und PALS bricht die Färbung abrupt ab, sodass diese Bereiche weitgehend ungefärbt bleiben. Dies passt relativ gut zu der Annahme, dass es zwischen dem offenen Kreislaufgebiet der Milz und der weißen Pulpa eine Grenze für das Eindringen von Substanzen mit höherem Molekulargewicht aus dem Blut gibt. Diese Molekulargewichtsgrenze dürfte bei Mäusen zwischen 49 und 69 kD liegen (Nolte et al., 2003). Robinson et al. (Robinson et al., 1986) haben das Molekulargewicht des Ox43-Antigens in der Membran von Makrophagen mit ca. 90 kD bestimmt. Leider wurde das Antigen bisher nicht weiter charakterisiert. Die ursprüngliche immunhistologische Darstellung von Ox43-Reaktivität in der Rattenmilz (Robinson et al., 1986) wurde mit einem indirekten Nachweissystem durchgeführt, das vermutlich sehr viel weniger sensitiv war als das von uns benutzte ABC-System. Aus diesem Grund dürfte die lösliche Komponente des Antigens in der Erstbeschreibung übersehen worden sein.

Da die gesamte MZ sich stark positiv für Ox43 darstellt, ergibt sich neben dem Nachweis von His57 (siehe unten) eine Möglichkeit, diese Region bei Ratten auch im Hinblick auf Nicht-B-Zellantigene selektiv darzustellen, nämlich durch Doppelfärbung mit Nachweis von VCAM-1 im ersten und Ox43 im zweiten Schritt.

B-Lymphozyten in der WP, speziell in der MZ

Die beschriebenen Resultate (Tabelle 4) legen nahe, dass die monoklonalen Antikörper His57 und His52 mit der Mehrzahl aller B-Lymphozyten in der MZ reagieren (Abb. 13, 28). Für His52 war die Reaktion mit MZ B-Lymphozyten bisher nicht bekannt, da dieser mAb als Reagenz zum Nachweis von Endothelzellen betrachtet wurde (Duijvestijn et al., 1992). Die Reaktion von His52 mit MZ B-Lymphozyten ist deutlich schwächer als diejenige mit His57 (Abb. 13, Abb. 28). Interessanterweise zeigen beide Antikörper neben der Reaktion mit MZ B-Lymphozyten auch eine Reaktion mit der Mehrzahl der B-Lymphozyten in Follikeln. Diese Färbung ist bei His52 schwächer als die Reaktion mit MZ B-Lymphozyten. Bei His57 unterscheiden sich jedoch beide Zellarten nur minimal (Abb. 13). In der ersten Publikation über His57 wiesen Dammers et al. (Dammers et al., 1999) mit durchflusszytometrischen Methoden nach, dass His57 vorwiegend bei typischen MZ-Lymphozyten vorkommt. Das Antigen ist nur bei 3% aller kleinen rezirkulierenden B-Lymphozyten der Milz vorhanden. Auch konnten sie zeigen, dass His57⁺-MZ-B-Lymphozyten aus kleinen rezirkulierenden B-Lymphozyten entstehen. Die Reaktion von His57 mit folliculären B-Lymphozyten in Schnitten wurde von Dammers et al. (Dammers et al., 1999; Dammers und Kroese, 2005) beschrieben, jedoch nicht weiter beachtet, bzw. als Hinweis auf intrafollikuläre Vorläuferzellen von MZ-B-Lymphozyten interpretiert. Leider ist bisher weder die Expression von His57 in Blutlymphozyten noch das detektierte Antigen bekannt.

Sollte es sich bei den B-Lymphozyten in den Follikeln und in der MZ von Rattenmilzen um die gleiche His57⁺-Zellart handeln, könnte dies Ausdruck eines Phänomens sein, das bei Mäusen beschrieben wurde. MZ-B-Lymphozyten wandern bei dieser Spezies offenbar zwischen der MZ und den Follikeln (Arnon et al., 2013; Cinamon et al., 2008; Ferguson, 2004; Tedford et al., 2017). Hierfür sind differenziell exprimierte Chemokin-Rezeptoren und Sphingosinphosphat-Rezeptoren verantwortlich. Es wird vermutet, dass MZ B-Lymphozyten bei Mäusen mit Hilfe ihres Oberflächen-Immunglobulins oder anderer Rezeptoren großmolekulare Antigene aus der MZ in die Follikel transportieren und dort auf FDCs deponieren. Auch bei Menschen könnte die Wanderung von "MZ-B-Lymphozyten" in die (oder aus den) Follikeln die mangelnde

Abgrenzungsmöglichkeit der MZ von der folliculären Mantelzone erklären (Steiniger et al., 2014). Voraussetzung für einen Transfer von Antigen wäre, dass FDCs auf ihrer Oberfläche Immunkomplexe besitzen, deren Affinität zum Antigen höher ist als die Affinität des Oberflächen-Immunglobulins von MZ-B-Lymphozyten. Zusätzlich oder alternativ könnten hochaffine Fc- und Komplementrezeptoren auf den FDCs eine Rolle spielen, falls das an Oberflächen-Immunglobulin gebundene Antigen auf MZ-B-Lymphozyten mit Antikörpern und Komplement besetzt wäre. Es ist nicht auszuschließen, dass MZ-B-Lymphozyten von Ratten bei ihrem Ortswechsel in die Follikel die Expression der Zielstrukturen von His52 und His57 herunterregulieren. Möglicherweise ist eine geringere Expression dieser Zelloberflächenmoleküle in Follikeln für die Abgabe von Antigen an FDCs oder für die anschließende Auswanderung aus den Follikeln günstig. Hier erweist es sich erneut als großer Nachteil, dass über die Zielstrukturen von His57 und His52 nicht mehr geforscht wurde.

Auch nach konventioneller HE-Färbung ergeben sich Hinweise auf die Anwesenheit von MZ-B-Lymphozyten in Follikeln. Diese Färbung zeigt aufgrund der dunklen Kernfärbung mit Hämalaun drei unterschiedlich angefärbte Bereiche in der WP: Die dunkelste Färbung weist die PALS auf, in der überwiegend kleine wandernde T-Zellen mit sehr kompakten Zellkernen vorkommen. Die Primärfollikel oder die Mantelzonen von Sekundärfollikeln sind deutlich heller gefärbt und die MZ weist die hellste Färbung auf (Abb. 1a). Folliculäre B-Lymphozyten bestehen aus inaktiven kleinen Zellen mit dunklen kompakten Zellkernen, die sich nicht von den Kernen der T-Zellen in der PALS unterscheiden. Die Tatsache, dass Primärfollikel dennoch heller wirken als die PALS, ist vermutlich auf eine Beimischung von MZ-B-Lymphozyten in den Follikeln zu erklären. MZ-B-Lymphozyten sind große Zellen mit relativ hellen Zellkernen, d.h. Zellen mit einer erhöhten Transkriptionsaktivität (Abb. 1a). Diese Zellen werden von den kleineren naiven folliculären B-Lymphozyten offenbar optisch überlagert, sodass sie einzeln nicht wahrnehmbar sind, obwohl sie zum farblichen Gesamteindruck der HE-Färbung beitragen. Die immunhistologische Färbung mit den mAbs His52 und His57 würde dagegen die im Follikel anwesenden aber nicht gefärbten kleinen rezirkulierenden B-

Lymphozyten optisch eliminieren.

Die MZ begleitet bei Ratten die PALS allseitig als breiter umgebender Raum. Eigenartigerweise wird sie jedoch in Richtung zur Oberfläche der Milz parallel zum Gefäßdurchmesser zunehmend schmaler und bricht am Übergang von Zentralarterien zu Arteriolen schließlich ab. Auch die Seitenäste der Zentralarterien werden nicht von Ausläufern der MZ begleitet und erscheinen deshalb als "Brücken" durch die MZ, MZBCs. Die MZ ist offenbar nur um Zentralarterien vorhanden. Besondere Eigenschaften des Endothels oder der glatten Muskulatur der Zentralarterien dürften somit an der Bildung der MZ entscheidend beteiligt sein.

Die Verteilung von His57 und His52 auf B-Lymphozyten erinnert an die Verteilung von CD1c bei Menschen, das in der Milz ebenfalls in Zellen der Mantelzone von Follikeln und peripher dieser Zone an der Follikeloberfläche vorkommt (Steiniger et al., unpubliziert). Interessanterweise hat CD1d, das homologe Antigen bei Ratten, eine deutlich andere Expression in der Milz und kommt dort u.a. auch auf Makrophagen vor (Monzon-Casanova et al., 2010).

Die Darstellung von Zelloberflächen-IgD bestätigt, dass die MZ bei Ratten ebenso wie die Follikeloberfläche bei Menschen (Steiniger et al., 2001) überwiegend schwach IgD-positive B-Lymphozyten enthält. Daneben kommen jedoch auch einzelne B-Lymphozyten mit starker IgD-Expression vor, die vermutlich rezirkulierenden naiven B-Lymphozyten entsprechen (Abb. 18, 19). In der oberflächlichen PALS findet sich zusätzlich eine deutlich sichtbare Schicht stark IgD-positiver Zellen. Im Hinblick auf B-Lymphozyten ist die MZ somit ein heterogen zusammengesetztes Kompartiment, das eine begrenzte Zahl von kleinen wandernden naiven B-Lymphozyten (IgD⁺) und vor allem typische große MZ B-Lymphozyten (IgD^{+/+}) enthält.

Vergleicht man die Verteilung von Ox33 (anti-CD45RA), das mit großer Wahrscheinlichkeit alle B-Lymphozyten detektiert, mit der von His57, so zeigt sich in der MZ eine sehr ähnliche Färbung mit beiden Antikörpern. In Follikeln färbt His57 jedoch oft deutlich weniger B-Lymphozyten als Ox33. Diese His57-

positiven Zellen liegen vor allem in der Peripherie der Follikel. Darüberhinaus ist die Färbung mit His57 in Follikeln schwächer als in der MZ, was bei Ox33 nicht der Fall ist (Abb. 13 und 24). Diese Färbemuster weisen darauf hin, dass sich nicht nur die MZ, sondern auch Primärfollikel, aus verschiedenen B-Lymphozytenarten zusammensetzen.

Auch in Sekundärfollikeln finden sich verschiedene B-Lymphozytenarten. Die Milz von ausgewachsenen Rattenmännchen, die unter spezifiziert pathogenfreien (SPF) Bedingungen gezüchtet und direkt nach Entnahme aus der Zucht untersucht wurden, enthält stets einige wenige Sekundärfollikel mit Keimzentren (Steiniger, unpubliziert). Die Doppelfärbung für VCAM-1 und His57 (Abb. 15) zeigt den Aufbau eines Sekundärfollikels sehr deutlich: VCAM-1 ist in der dunklen Zone des Keimzentrums nur wenig exprimiert. Es kommt jedoch sehr stark auf unregelmäßig angeordneten FDCs in der hellen Zone vor. In der Mantelzone lässt sich VCAM-1 nur schwach nachweisen und in der MZ fehlt es völlig. Die MMM sind mittelstark VCAM-1-positiv. Es ist deutlich erkennbar, dass His57-positive B-Lymphozyten nicht nur in der MZ und in Primärfollikeln, sondern auch in der Mantelzone von Sekundärfollikeln auftreten (Abb. 14).

Die Einordnung von MZ B-Lymphozyten bei Ratten ist bisher nicht nur im Hinblick auf ihre Lokalisation umstritten. Ursprünglich wurden die Zellen als B-Gedächtniszellen betrachtet. Zu dieser Annahme passte bisher nicht, dass bei Ratten nur wenige der B-Lymphozyten mit MZ-Phänotyp hypermutierte variable Abschnitte ihres Oberflächen-Immunglobulins zeigten (Hendricks et al., 2011). Neuere Untersuchungen (Hendricks et al., 2015, 2019) weisen allerdings darauf hin, dass der Prozentsatz solcher Zellen vom Rattenstamm und von der untersuchten Genfamilie für den jeweiligen Abschnitt der schweren Kette des jeweiligen Immunglobulins abhängt.

Die geringere Mutationsfrequenz bei Ratten im Vergleich zu Menschen könnte somit u.a. durch eine größere Anzahl von solchen Genfamilien bedingt sein (Hendricks et al., 2019). Dies schließt nicht aus, dass in der MZ sowohl „naive“ wie auch Gedächtnis-B-Lymphozyten vorkommen.

Das Migrationsverhalten dieser Zellen ist bei Nagetieren bisher nicht geklärt. Wesentlichste Aufgabe von MZ B-Lymphozyten scheint - ähnlich wie bei

Menschen - die Vermittlung schneller T-Zell-unabhängiger Antikörperreaktionen gegen Polysaccharid-Antigene zu sein. Darüberhinaus sind MZ B-Lymphozyten bei Ratten und Mäusen häufig autoreaktiv (Dammers und Kroese, 2005; Palm et al., 2015).

Lymphozytenwanderung und Lokalisation von Plasmablasten / Plasmazellen in der WP

Die Einwanderung von Lymphozyten im Bereich der WP ist bisher bei Ratten und Mäusen nur wenig untersucht worden. Sowohl für B- wie auch T-Lymphozyten dürften zwei verschiedene Einwanderungswege bestehen (Bajénoff et al., 2008; Brelińska et al., 1984; Chauveau et al., 2020; Mitchell, 1973; Nieuwenhuis und Ford, 1976; Pellas und Weiss, 1990; van Ewijk und van der Kwast, 1980; Willführ et al., 1990). Die Auswanderungswege sind weniger klar. Markierte transferierte Lymphozyten wandern einerseits aus dem Blut schnell über den Marginalsinus in die weiße Pulpa ein, andererseits gibt es offenbar einen zweiten langsameren Einwanderungsweg im Bindegewebe um feine Arteriolen, die sich aus Seitenästen der Zentralarterien ergeben. Diese Seitenäste, MZBCs, stellen bei Ratten und Mäusen Wanderungsstraßen für B- und T-Lymphozyten in Richtung auf die Follikel und die Zentralarteriolen dar. B-Lymphozyten aus MZBCs bewegen sich anschließend durch die oberflächliche PALS zu den Follikeln, während sich T-Lymphozyten in der PALS ansiedeln. Es gibt Hinweise darauf, dass T-Lymphozyten die WP über MZBCs auch wieder verlassen können (Bajénoff et al., 2008).

Die vorliegenden Befunde weisen darauf hin, dass - wie auch von anderen beschrieben (Eikelenboom et al., 1982; MacLennan et al., 2003) - zusätzlich wandernde Plasmablasten/Plasmazellen (siehe unten) die oberflächliche PALS und die MZBCs benutzen, um in die rote Milzpulpa zu wandern. Zusammengefasst bilden die Seitenäste der Zentralarterien und ihre umgebenden Stromazellen offenbar Verbindungswege zwischen WP und RP durch die MZ. Diese Verbindungen könnten je nach wandernder Zellart sowohl zur Ein- wie auch zur Auswanderung von Lymphozyten und Plasmablasten in Bezug auf die weiße Pulpa dienen. Bei sechs verschiedenen Tieren waren größere Haufen von intrazellulär stark

IgM-positiven Zellen in der äußeren PALS und in den MZBCs zu beobachten (Abb. 20). Die Zahl dieser Zellen differierte unabhängig von der Herkunft der Tiere oder den Haltungsbedingungen individuell erheblich. Auch war die Ansammlung intrazellulär IgM-positiver Zellen in der äußeren PALS und MZBCs im gleichen Schnitt lokal sehr unterschiedlich, sodass PALSs mit und ohne größere Mengen solcher Zellen nebeneinander lagen.

Ein neuer Befund ergab sich durch Doppelfärbung mit hoch verdünntem anti-IgM und anti-Ki-67 in Paraffinschnitten im Hinblick auf die Proliferation von Plasmablasten/Plasmazellen (Abb. 21-23). Diese Färbung war darauf eingestellt worden, kein Oberflächen-IgM, sondern nur intrazelluläres IgM in Plasmazellen und Plasmablasten nachzuweisen. Nur ca. 50% der intrazellulär IgM-positiven Zellen in der äußeren PALS und in den MZBCs exprimierten das proliferationsassoziierte Kernprotein Ki-67 (Abb. 21). Für diese Schätzung wurden ausschließlich Zellen betrachtet, deren Zellkern deutlich als gefärbt oder ungefärbt erkennbar war. Eine präzise Bestimmung der Zahl Ki-67-positiver und -negativer IgM-positiver Zellen wurde nicht durchgeführt, weil aufgrund der geringen Zellmengen eine extrem große Schnitzzahl hätte untersucht werden müssen, um statistisch relevante Ergebnisse zu erzielen. Noch erstaunlicher war der Nachweis einer geringen Zahl von nicht proliferierenden IgM-positiven Plasmazellen in den Follikeln bei allen sechs untersuchten Tieren. Die Zellen traten in den Follikeln an unterschiedlichen Stellen außerhalb von Keimzentren auf (Abb. 23) auf. Teilweise waren sie sicher der Mantelzone zuzuordnen. Eine Doppelfärbung mit anti-IgD wurde jedoch nicht durchgeführt, sodass nicht alle Zellen exakt in den Follikeln lokalisiert werden konnten.

Ki-67 wird allgemein als Molekül angesehen, das proliferierende Plasmablasten von nicht mehr proliferierenden Plasmazellen unterscheidet. Somit zeigt die Untersuchung, dass größere Mengen nicht proliferierender IgM-positiver Plasmazellen bei normalen SPF-Ratten in den typischen Migrationskompartimenten der WP vorkommen. Da immunreaktives Ki-67 im Kontext der Zellteilung mehrere Tage erhalten bleiben kann (Pitcher et al., 2002), ist dies sehr bemerkenswert. Es ist unter Umständen davon

auszugehen, dass die Mitose der Plasmazellen länger zurückliegt.

Die Plasmablasten/Plasmazellen könnten aus Sekundärfollikeln stammen oder in der äußeren PALS entstanden sein. Im letzteren Fall wäre damit zu rechnen, dass sich bei Primärreaktionen diese Plasmablasten anschließend in extrafollikulären Haufen (extrafollicular foci) außerhalb der WP an der Grenze zur RP oder in der RP ansiedeln und dort zu Plasmazellen differenzieren, die niedrig affines Ig sezernieren (Chan et al., 2009; Jacob, 1991; MacLennan et al., 2003). Die in unserer Arbeit vorgelegten Befunde weisen jedoch darauf hin, dass nicht proliferierende intrazellulär IgM-positive Plasmazellen bereits vor der Bildung extrafollikulärer Foci in der äußeren PALS vorkommen (Abb. 20) und dort auch Antikörper sezernieren könnten. Die von MacLennan et al. (MacLennan et al., 2003) geäußerte Ansicht, dass in der äußeren PALS nur antigenspezifisch stimulierte B-Lymphoblasten wandern, ist somit nicht völlig zutreffend und muss auf Plasmablasten und Plasmazellen ausgedehnt werden. Bisher wurden ausgereifte Plasmazellen - im Gegensatz zu Plasmablasten - als ortsständig angesehen, da sie auf spezielle Stromazellen in "Nischen" angewiesen sind, um zu überleben (Roth, K. et al., 2014).

Ob Ki-67-negative Plasmazellen (im Gegensatz zu Ki-67-positiven Plasmablasten) im "steady state" im Blut vorkommen, ist bisher weder bei Ratten, Mäusen oder Menschen eindeutig geklärt, da in die meisten Untersuchungen über Plasmazellen im Blut keine Färbung für Ki-67 einbezogen wurde.

Unsere Befunde weisen darauf hin, dass relativ weit ausgereifte nicht mehr proliferierende Plasmazellen sich zumindest bei "normalen" Ratten über erhebliche Strecken lokal bewegen können. Sie wandern nur in der oberflächlichen PALS, in den MZBCs und möglicherweise in der Mantelzone der Follikel und meiden die MZ. Warum die Plasmablasten/Plasmazellen auch an Stellen ohne erkennbare MZBCs lokale Ansammlungen in der äußeren PALS bilden, war zunächst nicht zu klären. Die in der äußeren PALS liegenden schwach CD163-positiven Makrophagen (Abb. 20) könnten in diesem Kontext eine Rolle spielen. Falls die IgM⁺-Plasmablasten/Plasmazellen jedoch an Ort und Stelle in der äußeren PALS und nicht in Keimzentren entstehen, ist es naheliegend, dass sie sich dort in möglicherweise monoklonalen Haufen ansammeln.

Erythrozyten, Granulozyten und T-Lymphozyten in der MZ

Neben der diffusen Reaktivität mit Ox43 weisen weitere Befunde darauf hin, dass die MZ bei Ratten zum offenen Milzkreislauf gehört: Die MZ enthält freie neutrophile Granulozyten und freie Erythrozyten, die sich eindeutig nicht in Gefäßen befinden. Beide Zellarten treten in der MZ nicht ganz so dicht auf wie in der RP, sind jedoch deutlich sichtbar vorhanden (Abb. 25-27). T-Lymphozyten finden sich diffus in der gesamten MZ, in der sie in vergleichbarer Verteilung vorkommen wie in der RP (Abb. 31, 34). Die Anordnung dieser Zellen unterscheidet sich somit deutlich von derjenigen bei Menschen. Menschen weisen häufig ringförmige T-Zellstraßen an der Oberfläche von Follikeln außerhalb der Mantelzone auf (Steiniger et al., 2001). Da die MZ zum offenen Kreislaufsystem der Milz gerechnet werden muss, ist es wahrscheinlich, dass die His57⁺IgD⁺-MZ-B-Lymphozyten aus der roten Milzpulpa in die MZ einwandern und diese auch auf gleichem Weg verlassen.

Makrophagen in der MZ

Die MZ von Ratten enthält neben den spezifischen MZ B-Lymphozyten Blutplasma, Erythrozyten, Granulozyten und auch kleine rezirkulierende Lymphozyten. Plasma und wandernde Zellen dürften aus zwei unterschiedlichen Richtungen in die MZ gelangen, nämlich einerseits aus dem MS, dessen Wand relativ durchlässig ist, und zum zweiten direkt oder indirekt aus den blutgefüllten Milzsträngen der RP. Obwohl die MZ wandernde Leukozyten und Erythrozyten enthält, stellt sie nicht nur im Hinblick auf die Mehrzahl der B-Lymphozyten und Stromazellen, sondern auch im Hinblick auf Makrophagen ein eigenständiges Kompartiment dar. Dies kommt dadurch zum Ausdruck, dass CD163-positive Makrophagen, die sowohl bei Ratten, Mäusen und Menschen in großer Menge in den Milzsträngen vorkommen, in der MZ fehlen (Dijkstra et al., 1985) (Abb. 29). Die MZ hat anstelle dieser Zellen einen Besatz mit besonderen Makrophagen, MZMs und MMMs, die sich bei Ratten vor allem durch die starke Expression von CD169 auszeichnen (Dijkstra et al., 1985) (Abb. 30). Die MMMs befinden sich im oberflächlichen Bereich der PALS und der Follikel am inneren Umfang des MS, d.h. vermutlich im Bereich der SMA-positiven Stromazellen (MRCs). Die detaillierte Lage von MMMs wird in der vorliegenden Arbeit nicht direkt untersucht, sie ist jedoch in Analogie zu

Mäusen (Kraal, 1992; Kraal und Mebius, 2006) an dieser Stelle anzunehmen. In Follikeln exprimieren die Makrophagen jedoch weder CD163 noch CD169 (Abb. 29, 30). Der spezifische Phänotyp der Makrophagen dürfte durch Interaktion mit B-Lymphozyten und Stromazellen in der jeweiligen Region zustandekommen (Grabowska et al., 2018).

CD169-positive Makrophagen sind bei Mäusen in der Lage, mit MZ B-Lymphozyten zu kooperieren und sie zu stimulieren (Veninga et al., 2015). Durch Mediatorsekretion und Antigenübertragung von CD169-positiven Makrophagen auf konventionelle dendritische Zellen werden jedoch auch T-Zell-vermittelte Immunantworten von diesen Makrophagen unterstützt (Grabowska et al., 2018; Martinez-Pomares und Gordon, 2012; van Dinther et al., 2019).

Speziesunterschiede der oberflächlichen Follikelregionen bei Ratten, Mäusen und Menschen

Bei Ratten sind SMA-positive Stromazellen in der PALS (FRCs) ähnlich verteilt wie bei Menschen und Mäusen. Ähnlich ist auch, dass sich die äußeren FRCs scheinbar kontinuierlich auf die Follikeloberflächen fortsetzen. Diese Zellen werden bei Mäusen als MRCs bezeichnet (Katakai et al., 2008; Katakai, 2012). Ein weiteres typisches Antigen von MRCs in der Milz von Mäusen, MAdCAM-1 (Katakai, 2012; Kraal et al., 1995), ist jedoch eigenartigerweise in Rattenmilzen nicht exprimiert (Iizuka et al., 2000 und eigene Beobachtung). Vermutlich handelt es sich bei den MRCs nicht um oberflächliche FDCs mit speziellem Phänotyp, sondern um eine völlig eigenständige Zellart. Doppelfärbungen mit mAb asm-1 und Antikörpern gegen Ratten-FDCs könnten hier weiterführen. Bei Ratten enthält das oberflächliche Kompartiment der Follikel mit Kontakt zum MS nicht nur SMA-positive Stromazellen, die MRCs, sondern auch spezialisierte CD169-positive MMMs (Abb. 30).

Bei Menschen dagegen bilden SMA⁺ Stromazellen ein sehr breites überwiegend MAdCAM-1-positives Netzwerk an der Oberfläche von Follikeln, das weit in die rote Pulpa hineinreicht. Bei Menschen existiert somit weder phänotypisch noch morphologisch ein Äquivalent der MZ, da sich der Phänotyp der Stromazellen grundlegend unterscheidet. Bei Ratten und Mäusen kommen weder SMA noch MAdCAM-1 in der MZ vor. Auch fehlt ein Marginalsinus bei

Menschen (Steiniger et al. 2006, 2014, 2015).

Die Stromazellen an der Oberfläche von Follikeln haben somit einen spezies-spezifischen Phänotyp. Dies dürfte auch für die bislang uncharakterisierten Stromazellen der MZ bei Ratten gelten. MAdCAM-1 ist ein für die Rezirkulation von Lymphozyten durch darmassoziierte lymphatische Gewebe wichtiges Adhäsionsmolekül. Die Milz entwickelt sich vermutlich in der Phylogenese aus der Darmwand oder in ihrer Nähe (Jönsson, 1985). Die Expression von MAdCAM-1 in der Milz könnte bei Menschen und Mäusen darauf hinweisen, dass das Organ im Lauf der Evolution eine Rolle bei der Rezirkulation von darmassoziierten Lymphozyten behalten hat. Es bleibt offen, ob in der MZ bei Ratten Stromazellen vorkommen, die andere attraktive Moleküle für darmassoziierte Lymphozyten exprimieren. Leider sind zur Zeit außer MAdCAM-1 sowie bestimmten Chemokinen und Chemokinrezeptoren keine weiteren Moleküle bekannt, welche die Wanderung darmassoziiertes Lymphozyten steuern.

Die Verteilung von humanen MZ B-Lymphozyten, die u.a. durch Expression von Zelloberflächen-IgM, eine schwache oder fehlende Expression von Zelloberflächen-IgD und die Expression von CD27 gekennzeichnet sind, scheint ebenfalls von der bisher angenommenen Verteilung bei Mäusen und Ratten abzuweichen. Bei Menschen treten MZ B-Lymphozyten sowohl in der Mantelzone von Follikeln wie auch außerhalb dieser Zone an der Follikeloberfläche auf. Diese B-Lymphozyten besetzen die gesamte Follikeloberfläche sowohl im Bereich der äußeren FDCs wie auch im Bereich der SMA/MAdCAM-1-positiven Stromazellen (Steiniger, 2015; Steiniger et al., 2018). Die in der vorliegenden Untersuchung gefundene Expression von His57- oder His52 auf B-Lymphozyten in Follikeln weist jedoch darauf hin, dass die Anordnung von MZ-B-Lymphozyten bei Ratten und Menschen trotz massiver Differenz der Stromazellen möglicherweise nicht so unterschiedlich ist.

Die vorgestellten Befunde weisen die MZ bei Ratten als ein eigenständiges Kompartiment aus und zeigen neue Wege auf, diese Region ohne Färbung von B-Lymphozyten mit Hilfe Stroma-assoziiertes Antigens darzustellen. Das Färbe-

muster des Antikörpers Ox43 und weitere Hinweise deuten darauf hin, dass die MZ Teil des offenen Milzkreislaufs mit einer inneren Diffusionsgrenze zu PALS und Follikeln ist. Die Befunde legen nahe, dass B-Lymphozyten mit MZ Phänotyp durch Follikel wandern und unterstützen die Auffassung, dass die oberflächliche PALS und die MZBCs nicht nur als Migrationsareale für Plasmablasten, sondern auch für Plasmazellen dienen. Ein direkter Beweis für Zellwanderung dürfte jedoch nur durch Mehrphotonen-Mikroskopie markierter Zellen in vivo möglich sein. Entsprechende Untersuchungen wurden bisher von verschiedenen Arbeitsgruppen bei Mäuselymphozyten und anderen immunkompetenten Zellen durchgeführt, jedoch leider noch nicht bei Ratten. Auch ist unklar, ob z. B. die Wanderungsdauer von Plasmablasten/Plasmazellen in vivo-Studien zulassen würde.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die mikroskopische Anatomie der Rattenmilz wurde kurz nach der Entwicklung der ersten monoklonalen Antikörper (mAbs) vor über 30 Jahren immunhistologisch beschrieben. Seit dieser Zeit sind keine weiteren umfassenden Darstellungen der Zellzusammensetzung dieses Organs erschienen. Die vorliegende Arbeit stellt mit einer aktuellen hochverstärkenden immunhistologischen Technik, der ABC (Avidin-biotinylierte Peroxidase) Komplex-Technik, Stromazellen, B- und T-Lymphozyten, sowie Makrophagen und Plasmablasten/Plasmazellen in der Milz von Ratten des Inzuchtstammes LEW dar. Ein besonderer Schwerpunkt liegt dabei auf der Zellzusammensetzung der Marginalzone (MZ), eines Grenzbereichs zwischen weißer und roter Milzpulpa.

Die verwendeten Antikörper bestätigten das bekannte Verteilungsmuster für B- und T-Lymphozyten in der Milz von Ratten. Darüberhinaus wiesen zwei mAbs, His57 und His52, B-Lymphozyten sowohl in der MZ wie auch in Follikeln nach. Beide Antikörper sollen laut Erstbeschreibung nicht mit kleinen rezirkulierenden B-Lymphozyten in der Milz reagieren. Das Färbemuster könnte demnach darauf zurückzuführen sein, dass MZ B-Lymphozyten bei Ratten ähnlich wie bei Mäusen zwischen der MZ und den Follikeln wandern. Der Phänotyp von MZ B-Lymphozyten bei LEW Ratten ließ sich als His57⁺⁺His52⁺IgM⁺IgD^{+/-} definieren. Er differiert somit vom Phänotyp kleiner rezirkulierender B-Lymphozyten (His57⁻His52⁻IgD⁺⁺).

Die Stromazellen der MZ ließen sich bei Ratten nicht positiv nachweisen. Ihr Phänotyp weicht offenbar von dem der oberflächlichen Stromazellen von humanen Milzfollikeln stark ab. Die Expression von ICAM-1 (CD54) durch MZ-Stromazellen war nicht analysierbar, da alle MZ B-Lymphozyten dieses Adhäsionsmolekül exprimierten. VCAM-1 (CD106) kam in der MZ fast nicht vor. Anti-Pan-Laminin zeigte ein retikuläres extrazelluläres Maschenwerk in der MZ, das offenbar von Stromazellen produziert wurde. Dieses Maschenwerk wurde auch durch den mAb Ox43 dargestellt. Darüberhinaus markierte Ox43 alle Bereiche des offenen Milzkreislaufs. Erstaunlicherweise wies Ox43 in anderen Organen deutlich erkennbar ein Membranantigen in verschiedenen Zellarten

nach. Es ist daher nicht auszuschließen, dass das erkannte Antigen auch löslich im Blut vorkommt und möglicherweise eine gerinnungshemmende Aktivität besitzt.

Intrazellulär IgM⁺⁺ Plasmablasten und Plasmazellen fanden sich in Haufen in der oberflächlichen T-Zellzone sowie in der Umgebung von Seitenästen der Zentralarteriolen, sogenannten "marginal zone bridging channels". Ungefähr die Hälfte dieser Zellen exprimierte Ki-67. Dies legt den Schluss nahe, dass nicht nur proliferierende Plasmablasten, sondern auch neu gebildete nicht mehr proliferierende Plasmazellen in der Lage sind, lokal über größere Strecken zu wandern. Es ist nicht auszuschließen, dass IgM⁺-Plasmazellen in der äußeren T-Zell-Zone entstehen.

Die MZ gehört eindeutig zum offenen Milzkreislauf, da sie neben dem Ox43-Antigen diffus angeordnete Erythrozyten und Granulozyten enthält, wenn auch in geringerer Menge als in der roten Pulpa. Der Besatz mit speziellen B-Lymphozyten, VCAM-1⁻ Stromazellen und CD169⁺⁺ Makrophagen zeigt, dass die MZ bei Ratten ein eigenständiges Milzkompartiment mit spezies-spezifischer Zellzusammensetzung ist. In der MZ halten sich sowohl kleine rezirkulierende B-Lymphozyten wie auch vor allem große voraktivierte B-Zellen, die vermutlich B-Gedächtniszellen darstellen, auf. Ob die Gedächtniszellen ebenso wie die Stromazellen der MZ spezies-spezifische Besonderheiten zeigen, ist nicht vollständig bekannt. Der Phänotyp der MZ-Stromazellen bleibt bei Ratten und Mäusen zu klären.

5. SUMMARY

The microscopic anatomy of rat spleens has been described by immunohistology 30 years ago shortly after monoclonal antibody (mAb) technology came up. Up-to-date surveys of rat splenic cell composition are lacking. In the present investigation a highly amplifying immunohistological technique, the ABC method, is applied to visualise stromal cells, B- and T-lymphocytes, macrophages and plasma cells/plasmablasts in spleens of the inbred LEW rat strain. Special emphasis is put on analysing cells in the splenic marginal zone (MZ), a border region between white and red pulp, which has originally been defined in rats.

The antibodies used confirmed the well-known distribution of B- and T-lymphocytes in the rat spleen. In addition, two mAbs, His57 and His52, stained the majority of B-lymphocytes in the MZ and B-cells in follicles. Both mAbs have been described not to react with small recirculating B-lymphocytes in the original publication. The staining pattern observed may be due to MZ B-lymphocytes migrating between MZ and follicles. The present investigation defines the phenotype of MZ B-lymphocytes in LEW rats as His57⁺⁺His52⁺IgM⁺IgD^{+/-}.

Stromal cells of the MZ could not be immunohistologically defined in rats. The phenotype of these cells obviously differs decisively from that of fibroblasts at the surface of human splenic follicles. Detection of ICAM-1 (CD54) was not informative, because all MZ B-lymphocytes expressed this adhesion molecule. In contrast, VCAM-1 (CD106) was almost absent in the MZ. Anti-pan-laminin showed an extracellular network in the MZ, which appeared to be produced by stromal cells. This network was also visualised by mAb Ox43. In addition, Ox43 targeted all parts of the open splenic circulation system. However, in other organs Ox43 produced typical membrane staining of different cell types. The so far uncharacterised Ox43 antigen could thus be a membrane molecule, which is also cleaved and circulates in the blood. It may have a coagulation-inhibiting function.

Plasmablasts and plasma cells with high amounts of intracellular IgM formed clusters in the outer T-cell zone and near side branches of the central arteries termed "marginal zone bridging channels". About half of these cells expressed Ki-67. This suggests that not only proliferating plasmablasts, but also newly formed non-proliferating plasma cells may migrate in the spleen for longer distances. It cannot be excluded that IgM⁺ plasma cells are formed in the outer T-cell zone.

The MZ clearly belongs to the open splenic circulation, because it harbours scattered erythrocytes and granulocytes. The presence of MZ B-cells, VCAM-1⁻ stromal cells and CD169⁺⁺ macrophages characterises the MZ as a unique species-specific splenic compartment. Rat MZs contain small recirculating B-lymphocytes and a predominant population of large pre-activated B lymphocytes which most likely correspond to memory B cells. Whether these cells exhibit species-specific traits similar to the stromal cells is not clear. The phenotype of MZ stromal cells remains to be established in rats and mice.

LITERATURVERZEICHNIS

- Arnon, T.I., Horton, R.M., Grigorova, I.L., Cyster, J.G. (2013). Visualization of splenic marginal zone B-cell shuttling and follicular B-cell egress. Nature **493**: 684–688.
- Bajénoff, M., Glaichenhaus, N., Germain, R.N. (2008). Fibroblastic reticular cells guide T lymphocyte entry into and migration within the splenic T cell zone. J. Immunol. **181** : 3947–3954.
- Balogh, P., Aydar, Y., Tew, J.G., Szakal, A.K. (2002). Appearance and Phenotype of Murine Follicular Dendritic Cells Expressing VCAM-1. Anat. Rec. **268**: 160-168
- Barclay, A.N. (1981). The localization of populations of lymphocytes defined by monoclonal antibodies in rat lymphoid tissues. Immunology **42**: 593–600.
- Bazin, H. (1990). Rat hybridomas and rat monoclonal antibodies. CRC Press. Florida, USA.
- Bazin, H., Beckers, A., Urbain-Vansanten, G., Pauwels, R., Bruyns, C., Tilkin, A.F., Platteau, B., Urbain, J. (1978). Transplantable IgD immunoglobulin-secreting tumors in rat. J. Immunol. **121**: 2077–2082.
- Biermann K. (2011). Das unterschätzte Tier. Wir Rattenmenschen. In: Zeit online. Verfügbar unter: <https://www.zeit.de/wissen/2011-09/unterschaetztes-tier-ratte>, zuletzt abgerufen am 18.01.2020
- Brelińska, R., Pilgrim, C., Reisert, I. (1984). Pathways of lymphocyte migration within the periaarterial lymphoid sheath of rat spleen. Cell Tissue Res. **236**: 661–667.
- Brideau, R.J., Carter, P.B., McMaster, W.R., Mason, D.W., Williams, A.F. (1980). Two subsets of rat T lymphocytes defined with monoclonal antibodies. Eur. J. Immunol. **10**: 609–615.
- Chan, T.D., Gatto, D., Wood, K., Camidge, T., Basten, A., Brink, R. (2009). Antigen affinity controls rapid T-dependent antibody production by driving the expansion rather than the differentiation or extrafollicular migration of early plasmablasts. J. Immunol. **183**: 3139–3149.
- Chauveau, A., Pirgova, G., Cheng, H.W., De Martin, A., Zhou, F.Y., Wideman, S., Rittscher J., Ludewig, B., Arnon, T.I. (2020). Visualization of T cell migration in the spleen reveals a network of perivascular pathways that guide entry into T zones. Immunity. **52**: 794-807.

- Cinamon, G., Zachariah, M.A., Lam, O.M., Foss, F.W., Cyster, J.G. (2008). Follicular shuttling of marginal zone B cells facilitates antigen transport. Nat. Immunol. **9**: 54–62.
- Crary, S.E., Buchanan, G.R. (2009). Vascular complications after splenectomy for hematologic disorders. Blood **114**: 2861–2868.
- Cullingford, G.L., Watkins, D.N., Watts, A.D.J., Mallon, D.F. (1991). Severe late postsplenectomy infection. Br. J. Surg. **78**: 716–721.
- Dammers, P.M., de Boer, N.K., Deenen, G.J., Nieuwenhuis, P., Kroese, F.G. (1999). The origin of marginal zone B cells in the rat. Eur. J. Immunol. **29**: 1522–1531.
- Dammers, P.M., Kroese, F.G.M. (2005). Recruitment and selection of marginal zone B cells is independent of exogenous antigens. Eur. J. Immunol. **35**: 2089–2099.
- Dammers, P.M., Visser, A., Popa, E.R., Nieuwenhuis, P., Kroese, F.G. (2000). Most marginal zone B cells in rat express germline encoded Ig VH genes and are ligand selected. J. Immunol. **165**: 6156–6169.
- Di Sabatino, A., Carsetti, R., Corazza, G.R. (2011). Post-splenectomy and hyposplenic states. The Lancet **378**: 86–97.
- Dijkstra, C.D., Döpp, E.A., Joling, P., Kraal, G. (1985). The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. Immunology **54**: 589–599.
- Doudna, J.A., Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. Science **346**: 1258096–1258096.
- Duarte, A.J., Carpenter, C.B., Strom, T.B. (1982). Expression of T cell differentiation antigens and Ia on rat cytotoxic T lymphocytes. J. Immunol. **128**: 580–584.
- Duijvestijn, A.M., van Goor, H., Klatter, F., Majoor, G.D., van Bussel, E., van Breda Vriesman, P.J. (1992). Antibodies defining rat endothelial cells: RECA-1, a pan-endothelial cell-specific monoclonal antibody. Lab. Invest. **66**: 459–466.
- Eikelenboom, P., Boorsma, D.M., van Rooijen, N. (1982). The development of IgM- and IgG-containing plasmablasts in the white pulp of the spleen after stimulation with a thymus-independent antigen (LPS) and a thymus-dependent antigen (SRBC): An immunohistoperoxidase study. Cell Tissue Res. **226**: 83–95.

- Engelhardt, M., Eber, S., Germing, U., Heimpel, H., Kern WV., Schmutz M. (2013). Prävention von Infektionen und Thrombosen nach Splenektomie oder funktioneller Asplenie. Leitlinie der DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie. Verfügbar unter: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/praevention-von-infektionen-und-thrombosen-nach-splenektomie-oder-funktioneller-asplenie/@@guideline/html/index.html>, zuletzt abgerufen am 17.01.2020
- Fasnacht, N., Huang, H.-Y., Koch, U., Favre, S., Auderset, F., Chai, Q., Onder, L., Kallert, S., Pinschewer, D.D., MacDonald, H.R., Tacchini-Cottier, F., Ludewig, B., Luther, S.A., Radtke, F. (2014). Specific fibroblastic niches in secondary lymphoid organs orchestrate distinct Notch-regulated immune responses. *J. Exp. Med.* **211**: 2265–2279.
- Ferguson, A.R. (2004). Marginal zone B cells transport and deposit IgM-containing immune complexes onto follicular dendritic cells. *Int. Immunol.* **16**: 1411–1422.
- Gerlach, C., Golding, M., Larue, L., Alison, M.R., Gerdes, J. (1997). Ki-67 immunoexpression is a robust marker of proliferative cells in the rat. *Lab. Invest.* **77**: 697–698.
- Gibbs, R.A., Weinstock G.M., Metzker M.L., Muzny D.M., Sodergren E.J., Scherer S. et al. (2004). Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature* **428**: 493-521.
- Golub, R., Tan, J., Watanabe, T., Brendolan, A. (2018). Origin and Immunological Functions of Spleen Stromal Cells. *Trends Immunol.* **39**: 503-514.
- Gotoh, S., Itoh, M., Fujii, Y., Arai, S., Sendo, F. (1986). Enhancement of the expression of a rat neutrophil-specific cell surface antigen by activation with phorbol myristate acetate and concanavalin A. *J. Immunol.* **137**: 643-650.
- Grabowska, J., Lopez-Venegas, M.A., Affandi, A.J., den Haan, J.M.M. (2018). CD169+ macrophages capture and dendritic cells instruct: The interplay of the gatekeeper and the general of the immune system. *Front. Immunol.* **9**: 2472.
- Hebel, R., Stromberg, M.W. (1986). Anatomy and embryology of the laboratory rat. BioMed Verlag. Wörthsee.
- Hendricks, J., Visser, A., Dammers, P.M., Burgerhof, J.G.M., Bos, N.A., Kroese, F.G.M. (2011). Class-switched marginal zone B cells in spleen have relatively low numbers of somatic mutations. *Mol. Immunol.* **48**: 874–882.
- Hendricks, J., Bos, N.A., Kroese F.G.M. (2018). Heterogeneity of memory marginal zone B cells. *Crit. Rev. Immunol.* **38**: 145-158.

- Hendricks, J., Visser, A., Dammers, P.M., Burgerhof, J.G.M., Bos, N.A., Kroese F.G.M. (2019). The formation of mutated IgM memory B cells in rat splenic marginal zones is an antigen dependent process. *PLoS One* **14**: e0220933.
- Hermans, M.H., Opstelten, D. (1991). In situ visualization of hemopoietic cell subsets and stromal elements in rat and mouse bone marrow by immunostaining of frozen sections. *J. Histochem. Cytochem.* **39**: 1627–1634.
- Hünig, T., Wallny, H.J., Hartley, J.K., Lawetzky, A., Tiefenthaler, G. (1989). A monoclonal antibody to a constant determinant of the rat T cell antigen receptor that induces T cell activation. Differential reactivity with subsets of immature and mature T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **169**: 73–86.
- Iannaccone, P.M., Jacob, H.J. (2009). Rats! *Dis. Model Mech.* **2**: 206–210.
- Iizuka, T., Tanaka, T., Suematsu, M., Miura, S., Watanabe, T., Koike, R., Ishimura, Y., Ishii, H., Miyasaka, N., Miyasaka, M. (2000). Stage-specific expression of mucosal addressin cell adhesion molecule-1 during embryogenesis in rats. *J. Immunol.* **164**: 2463–2471.
- Jacob, J. (1991). In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. I. The architecture and dynamics of responding cell populations. *J. Exp. Med.* **173**: 1165–1175.
- Jefferies, W.A., Green, J.R., Williams, A.F. (1985). Authentic T helper CD4 (W3/25) antigen on rat peritoneal macrophages. *J. Exp. Med.* **162**: 117–127.
- Jønsson, V. (1985). Comparison and definition of spleen and lymph node: A phylogenetic analysis. *J. Theor. Biol.* **117**: 691–699.
- Katakai, T. (2012). Marginal reticular cells: a stromal subset directly descended from the lymphoid tissue organizer. *Front. Immunol.* **3**: 200.
- Katakai, T., Suto, H., Sugai, M., Gonda, H., Togawa, A., Suematsu, S., Ebisuno, Y., Katagiri, K., Kinashi, T., Shimizu, A. (2008). Organizer-like reticular stromal cell layer common to adult secondary lymphoid organs. *J. Immunol.* **181**: 6189–6200.
- Khanna, K.M., McNamara, J.T., Lefrançois, L. (2007). In situ imaging of the endogenous CD8 T cell response to infection. *Science* **318**: 116–120.
- King, H., Shumacker, H.B. (1952). Splenic studies. I. Susceptibility to infection after splenectomy performed in infancy. *Ann. Surg.* **136**: 239–242.
- Kraal, G. (1992). Cells in the marginal zone of the spleen. *Int. Rev. Cytol.* **132**: 31–74.

- Kraal, G., Mebius, R. (2006). New insights into the cell biology of the marginal zone of the spleen. *Int. Rev. Cytol.* **250**: 175–215.
- Kraal, G., Schornagel, K., Streeter, P.R., Holzmann, B., Butcher, E.C. (1995). Expression of the mucosal vascular addressin, MAdCAM-1, on sinus-lining cells in the spleen. *Am. J. Pathol.* **147**: 763–771.
- Lüllmann-Rauch, R., 2009. Taschenlehrbuch Histologie. 3. Auflage. Stuttgart, Thieme Verlag. S. 314.
- MacLennan, I.C.M., Toellner, K.-M., Cunningham, A.F., Serre, K., Sze, D.M.-Y., Zuniga, E., Cook, M.C., Vinuesa, C.G. (2003). Extrafollicular antibody responses. *Immunol. Rev.* **194**: 8–18.
- Martinez-Pomares, L., Gordon, S. (2012). CD169+ macrophages at the crossroads of antigen presentation. *Trends Immunol.* **33**: 66–70.
- Mitchell, J. (1973). Lymphocyte circulation in the spleen. Marginal zone bridging channels and their possible role in cell traffic. *Immunology* **24**: 93–107.
- Monzon-Casanova, E., Steiniger, B., Schweigle, S., Clemen, H., Zdzieblo, D., Starick, L., Müller, I., Wang, C.-R., Rhost, S., Cardell, S., Pyz, E., Herrmann, T. (2010). CD1d Expression in paneth cells and rat exocrine pancreas revealed by novel monoclonal antibodies which differentially affect NKT cell activation. *PLoS ONE* **5**: e13089.
- Moxon, E.R., Goldthorn, J.F., Schwartz, A.D. (1980). Haemophilus influenzae b infection in rats: effect of splenectomy on bloodstream and meningeal invasion after intravenous and intranasal inoculations. *Infect. Immun.* **27**: 872–875.
- Nieuwenhuis, P., Ford, W.L. (1976). Comparative migration of B- and T-lymphocytes in the rat spleen and lymph nodes. *Cell. Immunol.* **23**: 254–267.
- Nolte, M.A., Beliën, J.A.M., Schadee-Eestermans, I., Jansen, W., Unger, W.W.J., van Rooijen, N., Kraal, G., Mebius, R.E. (2003). A conduit system distributes chemokines and small blood-borne molecules through the splenic white pulp. *J. Exp. Med.* **198**: 505–512.
- Palm, A.-K.E., Friedrich, H.C., Mezger, A., Salomonsson, M., Myers, L.K., Kleinau, S. (2015). Function and regulation of self-reactive marginal zone B cells in autoimmune arthritis. *Cell. Mol. Immunol.* **12**: 493–504.
- Pellas, T.C., Weiss, L. (1990). Migration pathways of recirculating murine B cells and CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *Am. J. Anat.* **187**: 355–373.
- Pitcher, C.J., Hagen, S.I., Walker, J.M., Lum, R., Mitchell, B.L., Maino, V.C., Axthelm, M.K., Picker, L.J. (2002). Development and homeostasis of T cell memory in rhesus macaque. *J. Immunol.* **168**: 29–43.

- Robinette, C.D., Fraumeni, J.F. (1977). Splenectomy and subsequent mortality in veterans of the 1939-45 war. Lancet **2**: 127–129.
- Robinson, A.P., White, T.M., Mason, D.W. (1986). MRC OX-43: a monoclonal antibody which reacts with all vascular endothelium in the rat except that of brain capillaries. Immunology **57**: 231–237.
- Rodrigues, F.G., Petroianu, A., Diniz, S.O.F., Cardoso, V.N., de Parreira, E.V. (2014). Scintigraphic study of the splenic circulation in rats. Rev. Colégio Bras. Cir. **41**: 345–350.
- Roth, K., Oehme, L., Zehentmeier, S., Zhang, Y., Niesner, R., Hauser, A.E. (2014). Tracking plasma cell differentiation and survival. Cytometry Part A **85**: 15-24.
- Salomon, F.-V., Geyer, H., Gille, U. (2008). Anatomie für die Tiermedizin. 3. überarbeitete und erweiterte Auflage. Stuttgart. Enke-Verlag. S. 749.
- Sanz, M.J., Marinova-Mutafchieva, L., Green, P., Lobb, R.R., Feldmann, M., Nourshargh, S. (1998). IL-4-induced eosinophil accumulation in rat skin is dependent on endogenous TNF-alpha and alpha 4 integrin/VCAM-1 adhesion pathways. J. Immunol. **160**: 5637–5645.
- Sasou, S., Satodate, R., Katsura, S. (1976). The marginal sinus in the perifollicular region of the rat spleen. Cell Tissue Res. **172**: 195-203.
- Skalli, O., Ropraz, P., Trzeciak, A., Benzonana, G., Gillessen, D., Gabbiani, G. (1986). A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. J. Cell Biol. **103**: 2787–2796.
- Snook, T. (1964). Studies on the perifollicular region of the rat's spleen. Anat. Rec. **148**: 149–159.
- Steiniger, B., Barth, P., Hellinger, A. (2001). The perifollicular and marginal zones of the human splenic white pulp. Am. J. Pathol. **159**: 501–512.
- Steiniger, B., Bette, M., Schwarzbach, H. (2011). The open microcirculation in human spleens: a three-dimensional approach. J. Histochem. Cytochem. **59**: 639–648.
- Steiniger, B., Timphus, E.M., Barth, P.J. (2006). The splenic marginal zone in humans and rodents: an enigmatic compartment and its inhabitants. Histochem. Cell Biol. **126**: 641–648.
- Steiniger, B., van der Meide, P.H. (1993). High-dose interferon-gamma alters the distribution of B lymphocytes and macrophages in rat spleen and lymph nodes. Immunology **78**: 461–467.

- Steiniger, B.S. (2015). Human spleen microanatomy: why mice do not suffice. *Immunology* **145**: 334–346.
- Steiniger, B.S., Barth, P.J. (2000). Microanatomy and function of the spleen. *Adv. Anat., Embryol. Cell Biol.* Band 151. Berlin, Heidelberg. Springer-Verlag. S. 1-100.
- Steiniger, B.S., Ulrich, C., Berthold, M., Guthe, M., Lobachev, O. (2018). Capillary networks and follicular marginal zones in human spleens. Three-dimensional models based on immunostained serial sections. *PLOS ONE* **13**: e0191019.
- Steiniger, B.S., Wilhelmi, V., Seiler, A., Lampp, K., Stachniss, V. (2014). Heterogeneity of stromal cells in the human splenic white pulp. Fibroblastic reticulum cells, follicular dendritic cells and a third superficial stromal cell type. *Immunology* **143**: 462–477.
- STIKO^{a)} (Ständige Impfkommision am Robert Koch-Institut), 2018. Empfehlungen der Ständigen Impfkommision (STIKO) beim Robert Koch-Institut – 2018/2019.
In: *Epidemiologisches Bulletin* 34/2018. Verfügbar unter: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2018/Ausgaben/34_18.pdf?__blob=publicationFile, zuletzt abgerufen am 17.01.2020
- STIKO^{b)} (Ständige Impfkommision am Robert Koch-Institut), 2019. Impfungen bei Asplenie. Verfügbar unter: https://www.rki.de/SharedDocs/FAQ/Impfen/AllgFr_Grunderkrankungen/FAQ01.html, zuletzt abgerufen am 17.01.2020
- Tamatani, T., Miyasaka, M. (1990). Identification of monoclonal antibodies reactive with the rat homolog of ICAM-1, and evidence for a differential involvement of ICAM-1 in the adherence of resting versus activated lymphocytes to high endothelial cells. *Int. Immunol.* **2**: 165–171.
- Tedford, K., Steiner, M., Koshutin, S., Richter, K., Tech, L., Eggers, Y., Jansing, I., Schilling, K., Hauser, A.E., Korthals, M., Fischer, K.-D. (2017). The opposing forces of shear flow and sphingosine-1-phosphate control marginal zone B cell shuttling. *Nat. Commun.* **8**: 2261.
- Theilacker, C., Ludewig, K., Serr, A., Schimpf, J., Held, J., Bögelein, M., Bahr, V., Rusch, S., Pohl, A., Kogelmann, K., Friesseke, S., Bogdanski, R., Brunkhorst, F.M., Kern, W.V. (2016). Overwhelming postsplenectomy infection: A prospective multicenter cohort study. *Clin. Infect. Dis.* **62**: 871–878.
- Tischendorf, F. (1969). Zur Geschichte der Milzforschung: Rückblick und Ausblick. In: *Ergebnisse der Anatomie und Entwicklungsgeschichte.* Band 42 Heft 3. Berlin, Heidelberg, New York. Springer-Verlag. S. 6.

- Uehara, K., Uehara, A. (2010). Vimentin intermediate filaments: the central base in sinus endothelial cells of the rat spleen. Anat. Rec. **293**: 2034–2043.
- van den Berg, T.K., Döpp, E.A., Brevé, J.J.P., Kraal, G., Dijkstra, C.D. (1989). The heterogeneity of the reticulum of rat peripheral lymphoid organs identified by monoclonal antibodies. Eur. J. Immunol. **19**: 1747–1756.
- van Dinther, D., Lopez Venegas, M., Veninga, H., Olesek, K., Hoogterp, L., Revet, M., Ambrosini, M., Kalay, H., Stöckl, J., van Kooyk, Y., den Haan, J. (2019). Activation of CD8⁺ T cell responses after melanoma antigen targeting to CD169⁺ antigen presenting cells in mice and humans. Cancers **11**: 183.
- van Ewijk, W., van der Kwast, T.H. (1980). Migration of B lymphocytes in lymphoid organs of lethally irradiated, thymocyte-reconstituted mice. Cell Tissue Res. **212**: 497–508.
- Veerman, A.J.P., van Ewijk, W. (1975). White pulp compartments in the spleen of rats and mice: A light and electron microscopic study of lymphoid and non-lymphoid celltypes in T- and B-areas. Cell Tissue Res. **156**: 417–441.
- Veninga, H., Borg, E.G.F., Vreeman, K., Taylor, P.R., Kalay, H., van Kooyk, Y., Kraal, G., Martinez-Pomares, L., den Haan, J.M.M. (2015). Antigen targeting reveals splenic CD169⁺ macrophages as promoters of germinal center B-cell responses: Cellular immune response. Eur. J. Immunol. **45**: 747–757.
- von Bassewitz, C., Leutner, A. (2015). Traumatische Milzruptur im Kindesalter. In: Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Kinderchirurgie. Verfügbar unter: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/006-112l_S1_Traumatische_Milzruptur_Kindesalter_2015-02-verlaengert_2.pdf, zuletzt abgerufen am 17.01.2020
- Willführ, K.U., Westermann, J., Pabst, R. (1990). Absolute numbers of lymphocyte subsets migrating through the compartments of the normal and transplanted rat spleen. Eur. J. Immunol. **20**: 903–911.
- Williams, A.F., Barclay, A.N., Clark, S.J., Paterson, D.J., Willis, A.C. (1987). Similarities in sequences and cellular expression between rat CD2 and CD4 antigens. J. Exp. Med. **165**: 368–380.
- Woollett, G.R., Barclay, A.N., Puklavec, M., Williams, A.F. (1985). Molecular and antigenic heterogeneity of the rat leukocyte-common antigen from thymocytes and T and B lymphocytes. Eur. J. Immunol. **15**: 168–173.

ANHANG

VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren:

Adamkiewicz, Baum, Becker, Bette, Brehm, Busch, Cetin, Feuser, Grundmann, Grzeschik,
Kinscherf, Koolman, Leonhardt, Lill, Luckmann, Lüers, Mueller, Müller, Mutters,
Neumüller, Oberthür, Oliver, Seitz, Steiniger, Quint, Rost, Sahmland, Schratt, Schütz,
Stahl, Weihe, Westermann, Wilhelm, Wrocklage

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt in erster Linie meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. Steiniger. Ohne ihre stete Unterstützung, unzähligen Sitzungen und aufmunternden Worte wäre diese Arbeit niemals fertig geworden. In besonderer Weise durfte ich durch sie meine Vorliebe für die Anatomie und Didaktik kennenlernen. Sie wird mir als ein Vorbild für die enorme Wichtigkeit von Frauen in der Wissenschaft, sowie in ihrer großen Bescheidenheit bei einer ungeheuren Menge an Wissen in Erinnerung bleiben. Meine besten Wünsche begleiten sie in den Ruhestand.

Niemals möglich geworden wäre diese Arbeit durch die Hilfe der Mitarbeiterinnen der Arbeitsgruppe, Frau Seiler und Frau Lampp sowie Frau Wilhelmi. Mit ihrer Unterstützung durfte ich die Methoden in einer sehr familiären Atmosphäre erlernen. Herrn Prof. Dr. Lobachev (Leibniz School of Business, Hannover) danke ich für sein offenes Ohr zu allen Fragen rund um grafische Gestaltung und Literaturverwaltungsprogrammen. Frau Lang und Frau Merte-Grebe danke ich außerdem für alle zusätzliche moralische Unterstützung.

Meine Familie und Schwiegerfamilie hat mir in allen Vorhaben stets den Rücken gestärkt und mich mit all ihrer Liebe getragen. Meine Mutter war mir dabei in jeder Hinsicht immer ein besonderes Vorbild, für Überzeugungen einzustehen. Mein Bruder ist mir immer ein wichtiger Ratgeber und bester Freund. Meiner Oma danke ich für jede liebevolle Umarmung und Zuversicht.

Eine Person, die mich in ganz besonderer Art und Weise geprägt hat, ist meine liebe Freundin Daisy. Ihr ist diese Arbeit ganz besonders gewidmet.

Zuletzt gilt mein Dank meiner großen Liebe, meinem Ehemann, für all seine Geduld, Aufmunterung und Liebe. Lange Nachmittage und Abende im Labor hat er, so oft er konnte, mit mir verbracht. Ihn an meiner Seite zu wissen, ist mein größtes Glück.

Möge Gott all unsere Bemühungen annehmen.